

UNTERSUCHUNGEN ZU SEQUENZIERUNGEN VON PEPTIDEN

A Isotopenmarkierte Phenylthiohydantoinamino-säuren

B Enzymatische Hydrolyse und HPLC-MS-Identifizierung
der Spaltprodukte

Marina Hartmann

München

1979

UNTERSUCHUNGEN ZU SEQUENZIERUNGEN VON PEPTIDEN

- A Isotopenmarkierte Phenylthiohydantoinamino-säuren
- B Enzymatische Hydrolyse und HPLC-MS-Identifizierung
der Spaltprodukte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Marina Hartmann
aus Berlin

1979



1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W. Schäfer
2. Berichterstatter: Professor Dr. Th. Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 27.Juni 1979

MEINEN ELTERN
MEINEM MANN

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Organische Chemie und Spektroskopie, Martinsried bei München, unter der Leitung von Herrn Privat.-Doz. Dr. W. Schäfer durchgeführt.

Bei Herrn Privat.-Doz. Dr. W. Schäfer möchte ich mich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und die persönliche Unterstützung bedanken.

Frl. G. Schild, Fr. E. Seifert-Schilling und Frl. I. Buhrow gilt mein Dank für die Aufnahme der Spektren, Frl. U. Müller und Frl. E. Weyher für die Durchführung der Elementaranalysen, Fr. E. Brose für die Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographischen Analysen und Herrn H. J. Musiol für die Messungen der Drehwerte.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555601_0005

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
1. Aminosäuren und Phenylsenföle	3
1.1 Synthesen	4
1.1.1 Phenylisothiocyanate (^{15}N -, p-Cl-, p-Br-)	4
1.1.2 Aminosäuremethylester-Hydrochloride	9
1.1.3 Aminosäuremethylester	9
1.2 3-Phenyl-2-thiohydantoinaminosäuren (^{15}N -, p-Cl-, p-Br-)	12
1.2.1 Darstellung der PTH-Aminosäuren aus den Aminosäureestern	13
1.2.2 Besonderheiten bei dieser Methode	18
1.2.2.1 Asparaginsäure	18
1.2.2.2 Glutaminsäure	20
1.2.2.3 Threonin und Serin	22
1.2.2.4 Alanin, N-Methylalanin und Homoserin	22
1.2.2.4.1 ^1H -NMR-Spektren	32
1.2.2.4.2 ^{13}C -NMR-Spektren	35
1.2.2.4.3 UV-Spektren	37
1.2.2.4.4 IR-Spektren	38
1.2.2.5 Tyrosin	41
1.2.3 Identifizierung mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	44
1.3 Anwendung auf die Sequenzierung	47
1.3.1 Abbau zweier Alanin enthaltender Dipeptide	48
2. Dipeptidylaminopeptidase I	49
2.1 Isolierung und Anreicherung von DAP I	49

	Seite
2.2 Spaltung mit DAP I	52
2.3 Derivatisierung der Spaltprodukte	53
3. HPLC von DNP-Dipeptiden	54
4. Diskussion der massenspektrometrischen Fragmentierungen der DNP-Dipeptide und DNP-Dipeptidmethylester	62
4.1 Sonderfragmentierungen	75
4.1.1 Methionin	75
4.1.2 Threonin und Serin	76
4.1.3 Phenylalanin	76
4.1.4 Tryptophan	77
4.1.5 Tyrosin	78
5. Spaltungsbeispiele	84
5.1 Gly-Leu-Tyr	84
5.2 Gly-Gly-Gly-Gly	87
5.3 Glukagon	89
EXPERIMENTELLER TEIL	93
ZUSAMMENFASSUNG	117
LITERATURVERZEICHNIS	119

Verwendete Abkürzungen

CM	Carboxymethyl
DAP I	Dipeptidylaminopeptidase I, Cathepsin C
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DNFB	2.4.-Dinitrofluorbenzol
DNP	2.4.-Dinitrophenol
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPRLC	Hochleistungsruddünnschichtchromatographie
MS	Massenspektrometrie
¹⁵ N	Stickstoffisotop 15
PC	Papierchromatographie
PTC	Phenylthiocarbamoyl
PTH	3-Phenyl-2-thiohydantoin
RP	reversed phase

Die Aminosäuren werden nach der Drei-Buchstabenregel
abgekürzt, Ausnahmen sind

β-Ala	β-Alanin
nLeu	Norleucin
hSer	Homoserin
nVal	Norvalin
DNP-Tyr	N,O-di-2.4-dinitrophenyl-Tyrosin
↓	
ODNP	

EINLEITUNG

Die Aminosäuresequenzanalyse von Peptiden ist der schrittweise Abbau der Peptidkette mit Hilfe chemischer^{1),2),3),4)} oder enzymatischer^{5),6)} Reaktionen. Die abgespaltenen Aminosäuren, Dipeptide oder Peptide müssen sicher identifiziert und charakterisiert werden können. Dazu dienen verschiedene Methoden wie Papier- oder Dünnschichtchromatographie^{7),8)}, Ionenaustauschchromatographie⁹⁾ und Papierelektrophorese¹⁰⁾, Gelfiltration¹¹⁾ oder Elektrofokussierung¹²⁾. In den meisten Fällen geht der Identifizierung eine Derivatisierung voraus. Die Derivatisierung der Sequenzbruchstücke kann vor der Spaltung erfolgen, so wie bei der Dinitrophenylierung mit 2.4-Dinitrofluorbenzol^{4),13)}, bei der Acylierung mit 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonsäurechlorid¹⁴⁾ und bei der Reaktion mit Phenylisothiocyanat¹⁾. Für die Identifizierung mit Hilfe der Gaschromatographie¹⁵⁾ oder der Massenspektroskopie¹⁶⁾ werden die Spaltprodukte häufig nach erfolgter Spaltung derivatisiert.

Eine Routinemethode in der Sequenzanalyse ist der Edman-Abbau¹⁷⁾. Nach der Derivatisierung und Spaltung wird das Phenylthiohydantoinderivat aus dem Spaltungsansatz extrahiert und identifiziert. Das verkürzte Peptid kann erneut dem Abbau unterworfen werden. Da alle Einzelschritte von Nebenreaktionen begleitet sind, werden die Ergebnisse mit fortschreitendem Abbau unklarer. Auch findet man wegen unvollständiger Reaktion bei vorangegangenen Abbauschritten mehrere Phenylthiohydantoinamino-säuren nebeneinander, von denen eine als Hauptbestandteil erkennbar sein muß. Um quantitative Aussagen bei der automatischen Peptidsequenzierung mit Hilfe der Massenspektrometrie machen zu können, müssen isotopenmarkierte Phenylthiohydantoin-

derivate synthetisiert werden.

Eine neue Methode der Sequenzanalyse von Polypeptiden beruht auf der enzymatischen Hydrolyse dieser zu Dipeptiden durch Dipeptidylaminopeptidase I¹⁸⁾. Die daraus resultierenden Dipeptide wurden bisher durch Papierchromatographie¹⁸⁾, Ionenaustauschchromatographie und Dünnschichtchromatographie an Polyamid oder Cellulose¹⁹⁾, Membrandiffusion und massenspektroskopische Identifizierung²⁰⁾ oder durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektroskopie²¹⁾ identifiziert. Als nachteilig erweist sich dabei, daß entweder der Zeitaufwand groß ist, daß einige Aminosäuren in den Dipeptiden während der Derivatisierung in andere umgewandelt werden (Gln → Glu, Asn → Asp), oder daß Reaktionen im Gaschromatographiesystem ablaufen, die einige Dipeptide zerstören²¹⁾. Diese Nachteile können überwunden werden. Dafür bietet sich die Hochdruckflüssigkeitschromatographie an, mit der bisher underivatisierte Aminosäure- und Peptidgemische^{22), 23)} schnell und präparativ getrennt worden sind. Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist eine Derivatisierung nicht unbedingt erforderlich. Sie kann aber auch Vorteile bringen. Eine Steigerung der Empfindlichkeit kann die Folge sein. Eine anschließende massenspektroskopische Untersuchung zur Sicherung der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Ergebnisse kann erleichtert werden.

Dies führt zur Problemstellung dieser Arbeit. Es sollte eine einfache Synthese für die ¹⁵N-Phenylthiohydantoinaminosäuren erarbeitet werden. Mit diesen Derivaten kann massenspektrometrisch eine quantitative Auswertung des Edman-Abbaus erfolgen.

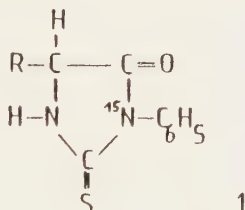
Das Enzym Dipeptidylaminopeptidase I sollte isoliert

und angereichert werden.

Um Dipeptidmischungen aus Dipeptidylaminopeptidase I-Hydrolysaten untersuchen zu können, sollte eine Methode zur Reinigung, Trennung und Identifizierung dieser Gemische entwickelt werden, die auf neuen chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen beruht.

1. Aminosäuren und Phenylsenföle

Die Entwicklung einer allgemeinen Synthese für die ^{15}N -Phenylthiohydantoine der Aminosäuren 1 erfordert geeignete Ausgangssubstanzen, wie es ^{15}N -Phenylsenföl, Aminosäuremethylester-Hydrochloride und Aminosäuremethylester sein können.



R = Aminosäureseitenkette

Unter Berücksichtigung neuer synthetischer, qualitativer und quantitativer Kriterien werden die Darstellungsmethoden für diese Substanzen beschrieben. Dabei ergibt sich die Verwendung der Aminosäuremethylester-Hydrochloride aus folgender Überlegung. Phenylisothiocyanat, p-Brom- und p-Chlorphenylsenföl reagieren mit Aminen zu den entsprechenden Thioharnstoffderivaten. So beschreibt Dixon²⁴⁾ die Umsetzung einer alkoholischen Lösung von Benzylamin mit einer alkoholischen Phenylsenföllösung bei Raumtemperatur zu N-Phenyl-N'-benzylthioharnstoff. Diese Reaktion kann

man auch als ersten Schritt des Edman-Abbaus betrachten. Dabei reagiert Phenylisothiocyanat mit den freien Aminogruppen von Peptiden und Proteinen unter Bildung von Phenylthiocarbamoylderivaten. Auch Aminosäuremethylester sollten mit Phenylsenfölen reagieren, denn die Carboxyfunktion des Aminosäuremoleküls ist bei den Aminosäuremethylestern blockiert; damit steht die freie nucleophile Aminogruppe für Verknüpfungsreaktionen zur Verfügung. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß Aminosäuremethylester und -Hydrochloride mit Phenylisothiocyanat in alkoholischer Lösung in hohen Ausbeuten zu den Phenylthiohydantoinen der Aminosäuren reagieren. Neben der Kopplung von Phenylsenfölen mit der Aminogruppe ist durch die Veresterung der Säurefunktion auch die Möglichkeit des Ringschlusses der Thioharnstoffe unter Methanoleliminierung gegeben.

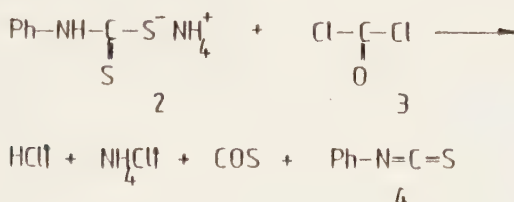
1.1 Synthesen

In den folgenden Abschnitten werden die Synthesen der Ausgangssubstanzen beschrieben und diskutiert.

1.1.1 Phenylisothiocyanate (^{15}N -, p-Cl-, p-Br-)

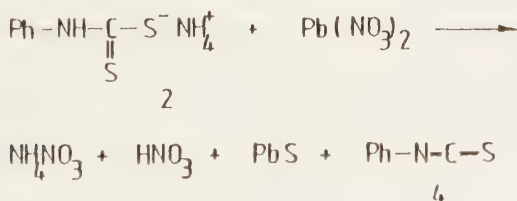
Bei der Synthese von ^{15}N -Phenylisothiocyanat (4) ist zu beachten, daß das wertvolle Ausgangsmaterial ^{15}N -Anilin möglichst quantitativ umgesetzt wird. In der Literatur²⁵⁾⁻³⁰⁾ sind verschiedene Darstellungen zur Synthese substituierter Phenylsenföle beschrieben. Diese Verfahren²⁵⁾⁻²⁷⁾ haben gemeinsam, daß zuerst aus den Aminen mit Schwefelkohlenstoff eine Dithiocarbaminsäure bzw. deren Ammoniumsalz (2) gebildet wird, aus der durch Abspaltung von Schwefelwasserstoff bzw. des entsprechenden Sulfides das Phenylsenfölen entsteht.

Slotta²⁵⁾ setzt so Anilin mit Schwefelkohlenstoff unter Durchleiten von Ammoniakgas zum Ammoniumsalz der Phenylldithiocarbaminsäure 2 um. Die Aufschlammung des trockenen 2 in Toluol gibt mit der berechneten Menge Phosgen (3) in der Kälte Chlorwasserstoff, der entweicht, Ammonchlorid, von dem abgesaugt wird, und Kohlenoxysulfid, das zum Teil in Toluol gelöst bleibt. Das Phenylisothiocyanat (4) wird mit 91% iger Ausbeute abdestilliert.

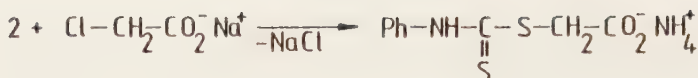


Ph = C₆H₅

Dians²⁶⁾ löst das ausgefallene Ammoniumphenylldithiocarbamat (2) in Wasser und versetzt es mit Bleinitrat. Dabei entsteht Bleisulfid. Das Phenylsenföhl wird durch Wasserdampfdestillation in einer Ausbeute von 74-78% isoliert.



Van der Kerk²⁷⁾ gibt zur wäßrigen Suspension des Ammoniumphenylldithiocarbamats (2) bei 30°C eine Lösung von Chloressigsäure in Wasser und neutralisiert mit Natriumcarbonat. Dann wird tropfenweise Zinkchlorid zugefügt, während gleichzeitig durch Zufügen von Natriumhydroxid pH = 7 gehalten wird. Die Ausbeute beträgt 65%.



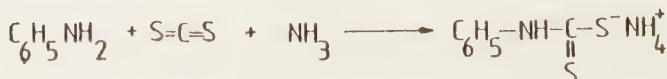
Fischer²⁸⁾ beschreibt die Synthese von N,N'-Diphenylthioharnstoff. Wird nach Gattermann²⁹⁾ dieses Thio=carbanilid mit konz. Salzsäure destilliert, so erhält man in fast quantitativer Ausbeute das Phenylsenföl.

Sakai³⁰⁾ erhält das Phenylisothiocyanat in 82%iger Ausbeute aus Anilin, Schwefelkohlenstoff und Äthylmagnesiumbromid.

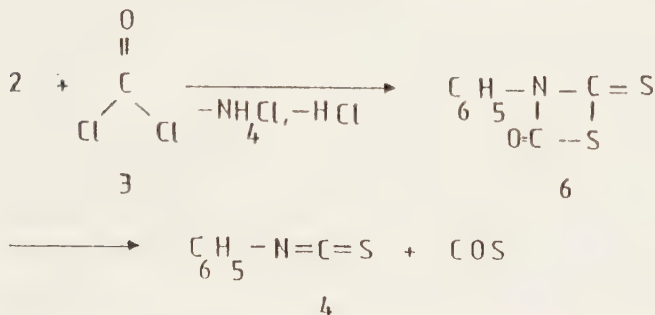
Da bei der Synthese von ¹⁵N-Phenylsenföl aus ¹⁵N-Anilin eine quantitative Umsetzung erwünscht ist, ist das Verfahren nach Fischer-Gattermann ungeeignet, da nur 50% des ¹⁵N-Anilin in das Phenylisothiocyanat übergehen.

Wir entschlossen uns zu Slottas²⁵⁾ Darstellung, da hierbei die höchsten Ausbeuten an Phenylsenföl zu erzielen sind. Trotz mehrfacher Versuche mit unmarkiertem Anilin 5 lagen die Ausbeuten aber nur bei 70%. Die Isolierung des Zwischenprodukts 2 zeigt, daß in diesem Reaktionsschritt eine 99%ige Umsetzung erfolgt. Bei der anschließenden Reaktion mit Phosgen 3, erhalten wir jedoch mehrere Nebenprodukte.

In der Literatur wird für diese Phenylsenfölsynthese folgender Reaktionsmechanismus angenommen:



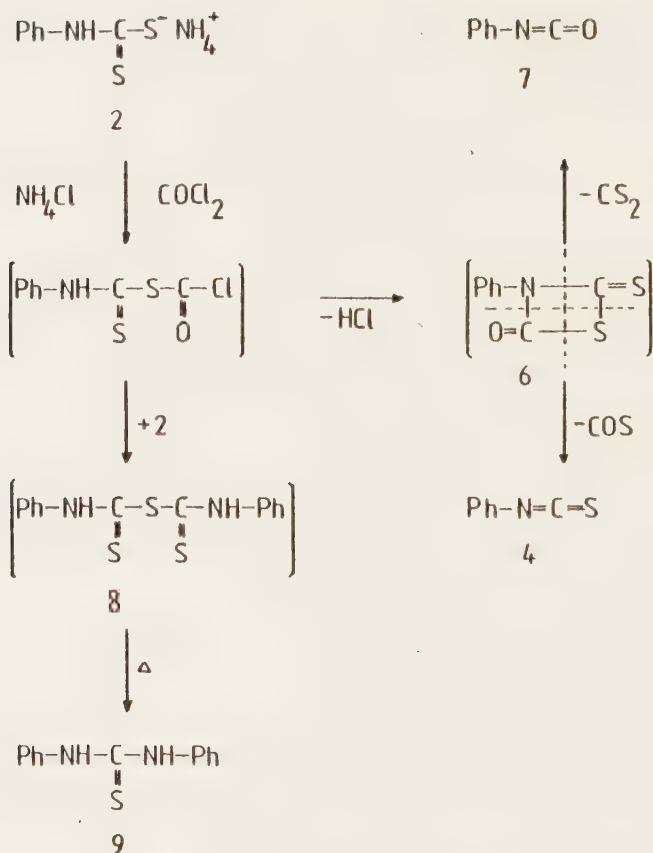
Zuerst wird durch nucleophile Addition von Anilin 5 an Schwefelkohlenstoff die Phenylldithiocarbaminsäure gebildet, die mit Ammoniak das Ammoniumsalz 2 gibt.



2 reagiert mit Phosgen 3 zum angenommenen Zwischenprodukt 6, das sich zu Kohlenoxysulfid und Phenylisothiocyanat (4) spaltet.

Die Spaltung des Vierrings in 6 kann auch so erfolgen, daß Schwefelkohlenstoff und Phenylisocyanat (7) entstehen. Dies wird durch unsere Untersuchungen bestätigt. Die massenspektrometrische Untersuchung des Destillationsvorlaufs, der Hauptfraktion und des Destillationsrückstandes ergibt im Vorlauf (Sdp.₁₂ 50°C) Phenylisocyanat (7), in der Hauptfraktion (Sdp.₁₂ 110°C) Phenylisothiocyanat (4), im Destillationsrückstand N,N'-Diphenylthioharnstoff (9) und eine unbekannte Substanz mit der Masse m/e 304, die möglicherweise die im Schema 1 angegebene Struktur 8 besitzt, aber nicht charakterisiert wurde.

Anhand des im Schema 1 dargestellten Reaktionsablaufs kann die Reaktion zum N,N'-Diphenylthioharnstoff (9) temperaturabhängig sein. Bei der Umsetzung von 2 bei 0°C mit Phosgen entsteht zu 74% Phenylisothiocyanat. Es folgt die Umsetzung jedoch bei -10°C, isoliert man verstärkt N,N'-Diphenylthioharnstoff. Dabei scheint



Schema 1 Phenylisothiocyanat und Nebenprodukte

offenbar die Bildung des Zwischenprodukts 8 bei tieferen Temperaturen gegenüber der von 6 bevorzugt zu sein. 8 kann beim Erhitzen unter Schwefelkohlenstoff=eliminierung in das Harnstoffderivat (9) übergehen. Eine Analogie zu dieser Reaktion ist die Zersetzung der Di-tert.-butyldithioltricarbonate und der entsprechenden Dicarbonat³¹⁾, die beim Erhitzen in Kohlendioxid und die Di- oder Monocarbonate übergehen.

Die präparative Darstellung von 8 gelang nicht. p-Brom- und p-Chlorphenylisothiocyanat wurden nach der Methode von Dains²⁶⁾ dargestellt. Hierbei wurde kein Wert auf besonders hohe Ausbeuten gelegt, sondern nur auf die Reinheit der Produkte.

1.1.2 Aminosäuremethylester-Hydrochloride

Schon 1906 wurden Aminosäuremethylester-Hydrochloride von E. Fischer³²⁾ aus Aminosäure-Hydrochloriden und Methanol mit Chlorwasserstoff als Katalysator hergestellt. Brenner et al.^{33a, b)} führten die Veresterung mit Methanol und Thionylchlorid durch.

Wir wählten diese Darstellungsmethode, da sie gegenüber der Fischer'schen einige Vorteile besitzt³⁴⁾.

Abweichungen von dieser Arbeitsweise sind aus Tabelle 1 durch die Angabe der von Brenner^{33a)} abweichenden Literatur ersichtlich.

So wurde Tryptophanmethylester-Hydrochlorid nach H. Peter et al.³⁵⁾ dargestellt. Auch hier werden Methanol/Thionylchlorid zur Veresterung verwendet, die Reaktionszeit ist aber von zwei Stunden bei 40°C auf 41 Stunden verlängert, wobei der Ansatz verschiedenen Temperaturen ausgesetzt ist.

Histidin-Hydrochlorid wird nach Davis³⁶⁾ in absolutem Methanol mit konz. Schwefelsäure am Rückfluß gekocht unter Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff.

1.1.3 Aminosäuremethylester

Die Aminosäuremethylester-Hydrochloride werden zur Verknüpfung als Aminkomponente durch Umsetzung mit ammoniakalischem Chloroform freigesetzt. Die Temperatur wird bei 0°C gehalten, um eine weitere Reaktion zu den Aminosäureamiden zu vermeiden³⁷⁾.

Tabelle 1 Aminosäuremethylester und deren Salze

Aminosäure		Schmp. (°C)	Lit. ³⁴⁾	hergestellt nach Lit.
Ala	b	103-106	109-111	33a
D-Ala	b	103-106	-	33a
Asn	b	75	-	33a
	a	e	-	38
Asp	c	e	-	33a
	d	e	-	37
	a	Sdp ₁₁ 117	181-182	37
Gln	a	e	-	38
Glu	c	81	-	33a
	d	e	-	33a
	a	146-147	149-150	40
Gly	b	174	175	33a
His	c	200	201	36
Hyp	b	162-164	162-164	33a
Ile	b	97	100-101	33a
	a	Öl	Öl	37
D-Ile	b	97	100-101	33a
Leu	b	146	151	33a
	a	Sdp ₁₂ 67-69	Sdp ₃ 12	37
Lys	c	206	212	
Met	b	146	145-146	33a
	a	e	Sdp ₁₁ 124	37
Pro	b	58	71	33a
	a	Öl	Öl	37
Ser	b	164	168	33a
	a	Öl	Öl	37
hSer	b	193	-	33a
	a	e	-	37
Thr	b	zähes Öl	-	33a
	a	e	70-72	37
Trp	b	207-209 ^{Zers}	213-214 ^{Zers}	35
	a	e	-	37

Fortsetzung Tabelle 1

Aminosäure		Schmp. (°C)	Lit. ³⁴⁾	hergestellt nach Lit.
Tyr	b	188	190	33a
	a	134	134-135	37
D-Tyr	b	186	-	33a
	a	e	-	37
Val	b	164-165	167	33a
D-Val	b	164-165	-	33a

a freier Ester

b Monohydrochlorid

c Dihydrochlorid

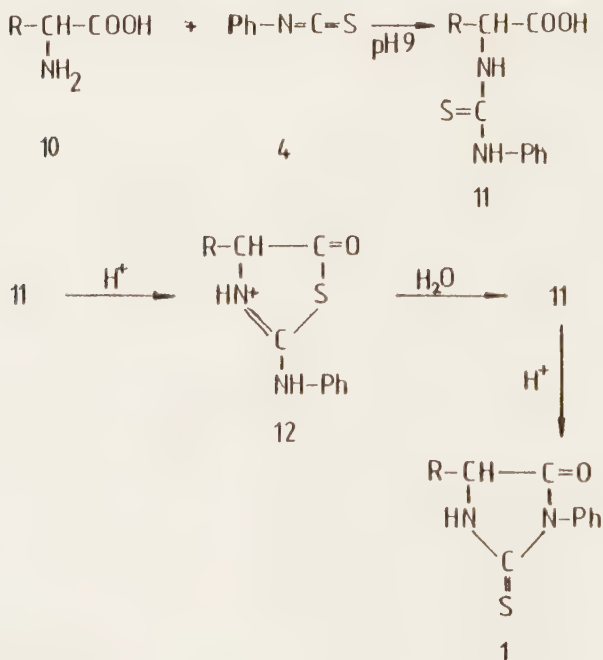
d Diester

e aus präparativen Gründen keine Schmp.-Bestimmung

Einige Aminosäuremethylester erhält man durch Veresterung N-geschützter Aminosäuren und anschließender Entfernung der Schutzgruppe. So lassen sich N-Acylamino-säuren wie N-Benzoyloxycarbonyl-glutamin und -asparagin unter besonders schonenden Bedingungen mit Diazomethan verestern³⁸⁾. Der Acylrest wird anschließend abhydriert. Die Synthese der α -Methylester der Aminodis-carbonsäuren gelingt im Fall der Glutaminsäure aus dem inneren Anhydrid dieser Aminosäure. So wird N-Benzoyloxycarbonylglutaminsäureanhydrid³⁹⁾ mit Methanol in Gegenwart von Dicyclohexylamin in Äther zum N-Benzoyloxycarbonylglutaminsäure- α -methylester-Dicyclohexylaminsalz umgesetzt⁴⁰⁾. Aus dem Salz erhält man den freien Halbester durch Behandeln mit Chlorwasserstoff in Essigsäureäthylester. Anschließendes Abhydrieren des Benzyloxycarbonylrestes liefert Glutaminsäure- α -methylester. Aus Glutaminsäure mit Acetylchlorid in Methanol oder Äthanol werden Glutaminsäure- γ -methyl- und - γ -äthylester dargestellt⁴¹⁾.

1.2 3-Phenyl-2-thiohydantoinaminosäuren (¹⁵N-, p-Cl- und p-Br-)

Die Phenylthiohydantoin der Aminosäuren haben große Bedeutung bei Sequenzuntersuchungen an Peptiden und Proteinen. Für die Darstellung von Referenzsubstanzen der entsprechenden Aminosäuren sind verschiedene Verfahren bekannt^{(2), (42), (43), (44), (45)}. Das Reaktionsschema 2 zeigt die Syntheseschritte, die nach Edman⁽⁴⁶⁾ zu den Phenylthiohydantoinen der Aminosäuren führen.



Ph = C₆H₅

R = Aminosäureseitenkette

Schema 2 Darstellung von PTH-Aminosäuren aus Aminosäuren und Phenylsenföl

Im ersten Schritt koppeln die Aminosäure 10 und das Phenylisothiocyanat (4) in schwach alkalischem Medium

zum Phenylthiocarbamylderivat 11. Die Zugabe von Säure führt zur Bildung des 2-Anilin-5-thiazolinonderivats 12, das sich in wäßrigem, saurem Medium in das isomere und stabile 3-Phenyl-2-thiohydantoinderivat 1 umlagert. Die Hydrolyse des Thiazolinons in die PTC-Aminosäure und die Zyklisierung zur entsprechenden PTH-Aminosäure können bei höherer Temperatur⁴²⁾, bei Raumtemperatur^{2), 43), 44)} und in der Kälte^{43), 44)} erfolgen.

1.2.1 Darstellung der PTH-Aminosäuren aus den Aminosäureestern

Entsprechend der Vorschrift²⁴⁾ für die Darstellung von N-Phenyl-N'-benzylthioharnstoff wird Leucinmethylester in einer alkoholischen Lösung mit einer alkoholischen Lösung des jeweiligen Phenylisothiocyanats versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht stehengelassen. Beim dünnschichtchromatographischen Vergleich des Niederschlags mit PTH-Leucin als Referenz zeigt sich eine Übereinstimmung der Rf-Werte. Wie erwartet, ist nach Addition der Aminogruppe von Leucinmethylester an das Phenylsenföhl Ringschluß zum PTH-Leucin unter Methanol-eliminierung erfolgt. Kernresonanz- und massenspektroskopische Untersuchungen bestätigen diesen Befund.

Wie aus den Tabellen 2, 3 und 4 zu sehen ist, reagieren die Aminosäuremethylester fast aller Aminosäuren in alkoholischer Lösung mit Phenylsenföhl und den substituierten Phenylisothiocyanaten in guten Ausbeuten unter Phenylthiohydantoinbildung. An einigen Beispielen wird gezeigt, daß auch die Aminosäuremethylester-Hydrochloride bei Zugabe eines geringen Überschlusses an Triäthylamin Aminosäurephenylthiohydantoin bilden (siehe experimenteller Teil allgemeine Vorschrift B). Diese neue Methode, Vergleichssubstanzen herzustellen, hat erhebliche Vorteile, auch wenn

Tabelle 2 3-Phenyl-2-thiohydantoin-aminosäuren und die ^{15}N -Derivate

Aminosäure	Ausgangssubstanz (Aminosäure-)	^{15}N -Anilin	Methode	Reaktionszeit (Std.)	Medium	Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	Lit. ⁴⁶⁾ (°C)
Ala	-OCH ₃	^{15}N	A	24	MeOH	90	183	185
	-OCH ₃		A	24	MeOH	90	183	
D-Ala	-OCH ₃		A	24	MeOH	84	181	
Asn	-OCH ₃	^{15}N	A	48	MeOH	82	232-34	235-37
	-OCH ₃		A	48	MeOH	97	232-34	
Gln	-OCH ₃	^{15}N	A	24	MeOH	77	216-17	201-11
	-OCH ₃		A	24	MeOH	57	214-16	Zers.
Gly	-OCH ₃	^{15}N	A	24	MeOH	57	244-45	244-48
	-OCH ₃		A	24	MeOH	74	238-41	Zers.
	-OCH ₃ .HCl		B	20	MeOH	90	244-45	
Hyp	-OCH ₃ .HCl	^{15}N	B	60	MeOH	71	136-38	
	-OCH ₃ .HCl		B	60	MeOH	26	136	
Ile	-OCH ₃	^{15}N	A	24	MeOH	88	172-74	173-75
	-OCH ₃		A	24	MeOH	87	172-74	
	-OCH ₃ .HCl		B	24	MeOH		173-74	
D-Ile	-OCH ₃ .HCl		B	24	MeOH		173-74	
	-COOH		C		Py/H ₂ O	82	172-74	

Py = Pyridin

Fortsetzung Tabelle 2

Aminosäure	Ausgangssubstanz (Aminosäure-) ^{15}N -Anilin	Methode	Reaktionszeit (Stdn.)	Medium	Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	Lit. ⁴⁶⁾ (°C)
Ile	-COOH	C		Py/H ₂ O	47	176-77	
Leu	-OCH ₃	A	24	MeOH	92	178	178
	-OCH ₃ ·HCl	B	24	MeOH	90	179	
	^{15}N	B	24	MeOH	92	178	
Lys	-OCH ₃ ·2HCl	B	84	Dio/H ₂ O (4:1)	100	167-69	162-64
	-OCH ₃ ·2HCl	B	60	Dio/H ₂ O (4:1)	82	162-65	
Met	-OCH ₃	A	24	MeOH	89	129	132
Phe	-OCH ₃	A	24	MeOH	89	182	187
	-OCH ₃	A	24	MeOH	87	183	
	-COOH	C		Py/H ₂ O	88	182-84	
Pro	-OCH ₃	A	48	MeOH	92	179	179
	-OCH ₃	A	48	MeOH	88	171-72	
Ser	-OCH ₃ ·HCl	B	20	MeOH	91	226	176-78
	-OCH ₃ ·HCl	B	20	MeOH	70	228	Zers.
Thr	-OCH ₃	A	24	MeOH	82	209	194-98
	-OCH ₃	A	24	MeOH	72	204	Zers.
Trp	-OCH ₃ ·HCl	B	20	Dio/H ₂ O (3:2)	85	176	177
	-OCH ₃ ·HCl	B	60	THF	72	173-78	

Dio = Dioxan, THF = Tetrahydrofuran

Fortsetzung Tabelle 2

Aminosäure	Ausgangssubstanz (Aminosäure-)	¹⁵ N-Anilin	Methode	Reaktionszeit (Std.)	Medium	Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	Lit. (°C)
Tyr	-OCH ₃	¹⁵ N	A	24	MeOH	84	215	216
	-OCH ₃		A	24	MeOH	92	217-18	
D-Tyr	-OCH ₃		A	24	MeOH	70	215	
	-COOH		C		Py/H ₂ O	74	214	
Tyr	-COOH		C		Py/H ₂ O	89	214	
Val	-OCH ₃ .HCl	¹⁵ N	B	17	MeOH	92	206	206
	-OCH ₃ .HCl		B	17	MeOH	91	206	
	-COOH		C		Py/H ₂ O	77	204	
	-OCH ₃ .HCl		B		MeOH	82	204-05	
D-Val	-COOH		C	17	Py/H ₂ O	85	204	

Tabelle 3 p- Brom-3-phenyl-2-thiohydantoin-aminosäuren

Aminosäure	Ausgangssubstanz (Aminosäure-)	Methode	Reaktionszeit (Std.)	Medium	Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	Lit. (°C)
Ala	-OCH ₃ .HCl	B	22	MeOH	66	204-05	196-98
Leu	-OCH ₃ .HCl	B	22	MeOH	92	183-84	178-79
Met	-OCH ₃ .HCl	B	23	MeOH	81	132-34	143-44
Phe	-OCH ₃ .HCl	B	23	MeOH	90	223	194-96

Tabelle 4 p-Chlor-3-phenyl-2-thiohydantoin-aminosäuren

Aminosäure	Ausgangssubstanz (Aminosäure-)	Methode	Reaktionszeit (Stdn.)	Medium	Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	Lit. (°C) (47)
Ala	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	92	199-203	187-88
Gly	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	90	224	
Ile	-OCH ₃	A	20	MeOH	96	167-69	
Leu	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	89	170-72	171-73
Lys	-OCH ₃ .2HCl	B	20	MeOH	90	126-32	
Met	-OCH ₃	A	20	MeOH	97	138	
	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	84	138	
Phe	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	89	218-19	190-92
Pro	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	77	149-52	
Ser	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	89	214-21	177-79
Thr	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	86	201-03	192-94
Tyr	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	93	219	
Val	-OCH ₃ .HCl	B	20	MeOH	92	188	178-80

man erst die Aminosäureester-Hydrochloride oder Aminosäureester synthetisieren muß:

1. Man kann bei Raumtemperatur arbeiten.
2. Es ist kein Kochen in Säure notwendig. Serin, Threonin und Cystein werden nicht dehydratisiert.
3. Es ist kein Überschuß an Phenylsenföhl erforderlich, wie bei der Umsetzung von Aminosäure mit Phenylisothiocyanat nach Edman (siehe allgemeine Vorschrift C im experimentellen Teil)
4. Asparagin und Glutamin werden nicht hydrolysiert.

1.2.2 Besonderheiten bei dieser Methode

Bei der Synthese einiger Phenylthiohydantoine von Aminosäuren beobachtet man Nebenreaktionen, die zu Hauptreaktionen werden können, wenn man die Reaktionsbedingungen ändert.

1.2.2.1 Asparaginsäure

Setzt man eine alkoholische Lösung von Asparaginsäuredimethylester (siehe Tabelle 1) mit Phenylsenföhl um, so erhält man nicht das erwartete in der γ -Carboxylgruppe methylierte PTH-Derivat. Der Ringschluß erfolgt nicht über die Methylgruppe an C1, sondern über die C4-Methylgruppe. Es entsteht das energetisch begünstigtere Hexahydro-4-methoxycarbonyl-1-phenyl-2-thioxo-1,3-diazin (13).

Die Struktur von (13) ist durch das Massen- und ^1H -NMR-Spektrum Abb. 1 gesichert.

Im NMR-Spektrum beobachtet man die beiden nicht äquivalenten Protonen der Methylengruppe bei $\delta = 2.86$ ppm ($J_{\text{CH}_2} = 18$ Hz). Das Proton an C4 bei $\delta = 4.56$ ppm ist durch 2 Kopplung mit der CH_2 -Gruppe und dem Proton an N3 zu einem Multiplett aufgespalten ($J_{\text{bc}} = 4$ Hz,

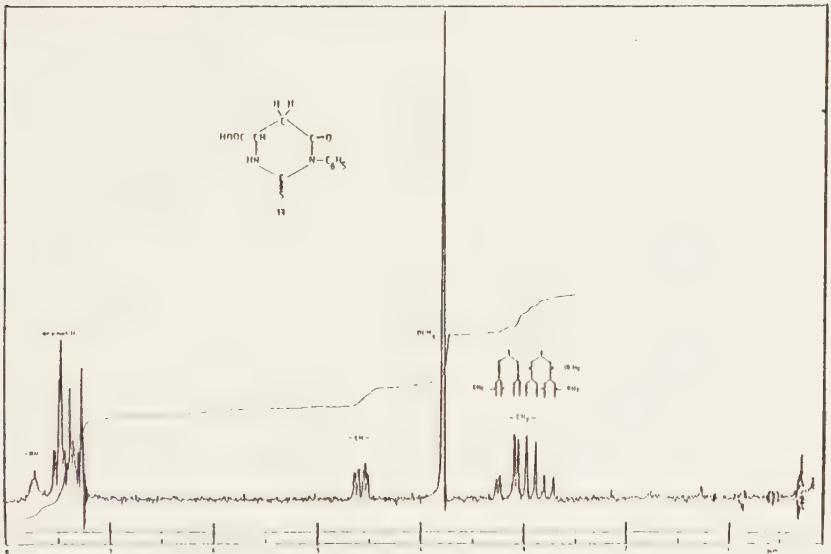


Abb. 1 100 MHz-¹H-NMR-Spektrum von (13) in CDCl₃

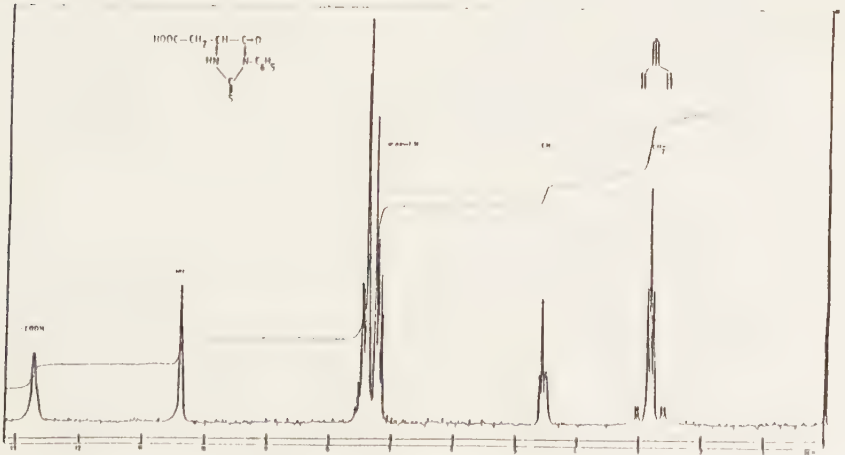
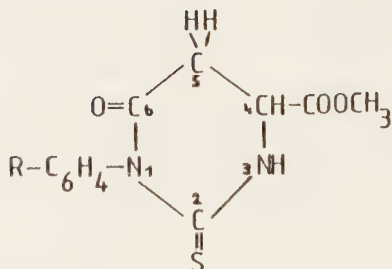


Abb. 2 90 MHz-¹H-NMR-Spektrum von PTH-Asp in d₆DMSO



R = H 13

13

= Br 13a

= Cl 13b

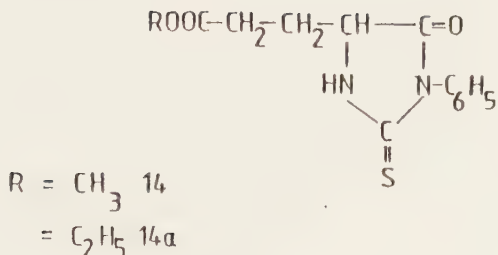
$J_{ac} = 9 \text{ Hz}$). Bei den PTH-Aminosäuren beobachtet man diese Beeinflussung der Aufspaltung des Protons in α -Stellung zur Carbonylgruppe durch das Proton am benachbarten Stickstoff nicht.

Das Massenspektrum von (13) zeigt mit dem Molekülion m/e 264 (100%) an, daß gegenüber dem PTH-Asp (M^+ , 250) eine Veresterung erfolgt ist. Die Fragmente m/e 203, m/e 204, m/e 205, m/e 135 und m/e 77 sind auch im Phenylthiohydantoin als Bruchstücke zu finden.

Die substituierten Phenylsenföle reagieren mit Asparaginsäuredimethylester in Methanol ebenfalls unter Sechsringbildung (13a, 13b).

1.2.2.2 Glutaminsäure

Die Umsetzung von Glutaminsäuredimethylester (siehe Tabelle 1) mit Phenylsenföl in Methanol liefert 3-(3-Phenyl-2-thio-5-hydantoin)propionsäuremethylester (14). Die Reaktion verläuft gegenüber dem Asparaginsäuredimethylester langsamer. Untersucht man bei gleicher Reaktionszeit das Rohprodukt eines Ansatzes massenspektrometrisch, so findet man neben 14 auch noch die offene Verbindung PTC-Glu(OCH_3) OCH_3 . Beim Erwärmen in



Methanol/Wasser tritt jedoch vollständiger Ringschluß ein.

Die Umsetzung von Glutaminsäure-4-methylester in methanolischer Lösung ergibt bei variablen Ausbeuten kein einheitliches Produkt. Massenspektren zeigen neben der Entstehung von PTH-Glu (M^+ , 264) N,N'-Diphenylthioharnstoff (M^+ , 228) und PTH-Glu(OCH_3) (M^+ , 278). Eine dünn-schichtchromatographische Trennung der Produkte gelang nicht. In Lit.⁴⁶⁾ ist ein Hinweis zu finden, daß in den Fällen von PTH-Asp und PTH-Glu bei der Umkristallisation Alkohol vermieden werden sollte, da in Gegenwart von Äthanol Veresterung der γ -Carboxylgruppe stattfindet. Da bei der vorliegenden Methode Methanol das Reaktionsmedium ist, muß mit der Veresterung gerechnet werden, wie sich auch bei den beschriebenen Versuchen zeigt. Die Umsetzung der Glutaminsäuremethyl- oder -äthylester in Tetrahydrofuran mit Phenylsenföhl führt nicht zur Phenylthiohydantoinbildung.

Setzt man die in Kapitel 1.1.3 beschriebenen γ -Glutaminsäureester ein, so erhält man in geringer Ausbeute die Substanzen 14 und 14a.

Die Darstellung von PTH-Glu gelingt mit dieser Methode nicht.

1.2.2.3 Threonin und Serin

In der Literatur^{2), 43), 46)} werden PTH-Ser und PTH-Thr nur in geringen Ausbeuten erhalten. Beide Verbindungen neigen zu β -Eliminierung. PTH-Ser zeigt Polymerisations-tendenz. Bei der hier vorgestellten Methode treten keine Schwierigkeiten während der PTH-Bildung auf. Die Ausbeuten liegen sehr viel höher (siehe Tabelle 2). Der Schmelzpunkt von PTH-Ser ist 228°C gegenüber dem Zersetzungspunkt 176-178°C Lit.⁴⁶⁾.

1.2.2.4 Alanin, N-Methylalanin und Homoserin

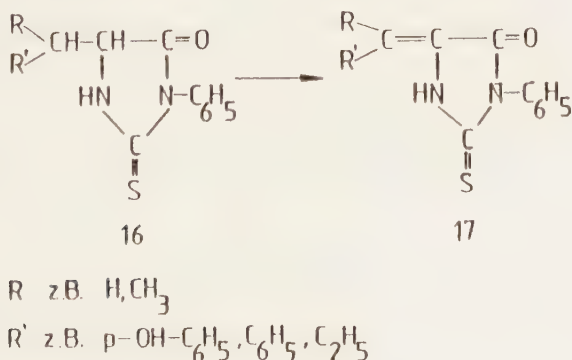
Für die Spaltung von Methioninpeptiden eignet sich nach Wittkop⁴⁸⁾ Bromcyan besonders. Das Reagenz reagiert mit dem Thioäther der Seitenkette von Methionin und ergibt eine Mischung von Homoserin und Homoserinlaktone. Die der Carboxylgruppe des Methionins benachbarte Bindung wird hydrolytisch gespalten. Alle Fragmente der Bromcyan-spaltung enthalten so C-terminal Homoserin bzw. das Laktone. Bei der Sequenzierung solcher Peptidfragmente wird das Entstehen von PTH-Homoserin vorausgesetzt. Eine Referenzsubstanz existiert aber nicht. Für quantitative massenspektrometrische Untersuchungen ist das PTH-hSer von Bedeutung, denn der Abbau nach Edman mit Phenylisothiocyanat verläuft bei den verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich. Dies führt häufig zu einer Überlappung von PTH-Aminosäuren mit einer Hauptkomponente im jeweiligen Sequenzierungsschritt, was in der Massenspektrometrie und in der Hochdruckflüssigchromatographie gezeigt werden kann.

Setzt man Homoserinmethylester-, Alaninmethylester- und N-Methylalaninmethylester-Hydrochlorid nach Methode B mit Phenylsenföl und Triäthylamin in methanolischer

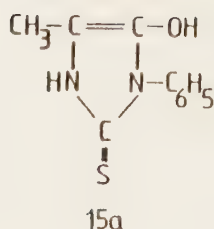
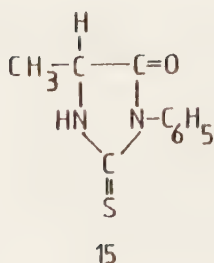
Lösung um, so isoliert man neben den PTH-Aminosäurederivaten isomere Verbindungen.

Die Schmelzpunkte dieser Substanzen liegen höher als die der entsprechenden PTH-Derivate.

In Dünnschichtchromatogrammen (Laufmittel: Chloroform-Essigsäureäthylester 9:2, Äthanol-Wasser 7:3 und Benzol-Aceton 5:1) sind die R_f-Werte niedriger als die der PTH-Derivate, sie sind also polarer. Während die PTH-Derivate mit Ninhydrin/Collidin eine Färbung zeigen (PTH-Ala rotviolett und PTH-hSer gelb), lassen sich die isomeren Produkte nicht anfärben. Die Anfärbung der Phenylthiohydantoine von Aminosäuren mit Ninhydrin wurde von Roseau und Pantel⁴⁹⁾ eingeführt. Schäfer⁵⁰⁾ erklärte den Chemismus der Farbstoffbildung. Danach werden Phenylthiohydantoine 16 mit dem als Anfärbereagenz benutzten Gemisch aus Ninhydrin/Collidin/Äthanol zu 17 dehydriert.



Folgende Verbindungen wurden isoliert bzw. nachgewiesen. Bei der Umsetzung von Alaninmethylester-Hydrochlorid mit Phenylsenföhl und Triäthylamin in methanolischer Lösung (Methode B), kristallisieren aus einem Ansatz nacheinander zwei Substanzen aus. Die zuerst kristallisierende Verbindung ist PTH-Ala 15, während der später

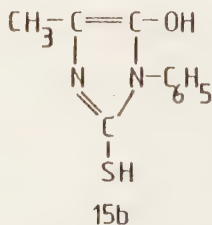


kristallisierenden aus chemischen und spektroskopischen Daten (siehe Abbildung 4) die Struktur 15a zugeordnet wird.

Die Schmelzpunkte sind nach dem Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser für 15 176°C und für 15a 261°C.

Die Nichtanfärbbarkeit von 15a läßt darauf schließen, daß der Wasserstoff am C5 des Thiohydantoinrings nicht vorhanden ist. Die Struktur eines Dehydroalanins (in 17 R und R' = H) konnte auf Grund des Massenspektrums ausgeschlossen werden. Die Massenspektren zeigen für beide Substanzen 15 und 15a $M^+ 206$ als Molekülionenpeak.

Einem weiteren Isomeren, das jedoch nur im Gemisch mit 15a nachgewiesen werden kann, wird die Struktur 15b zugeordnet.



Die Strukturen 15, 15a und 15b sind isomer. Es liegen eine Keto-Enol- und eine Amid-Imid-Tautomerie vor. Die Tautomerie wurde am Acetessigester am besten unter-

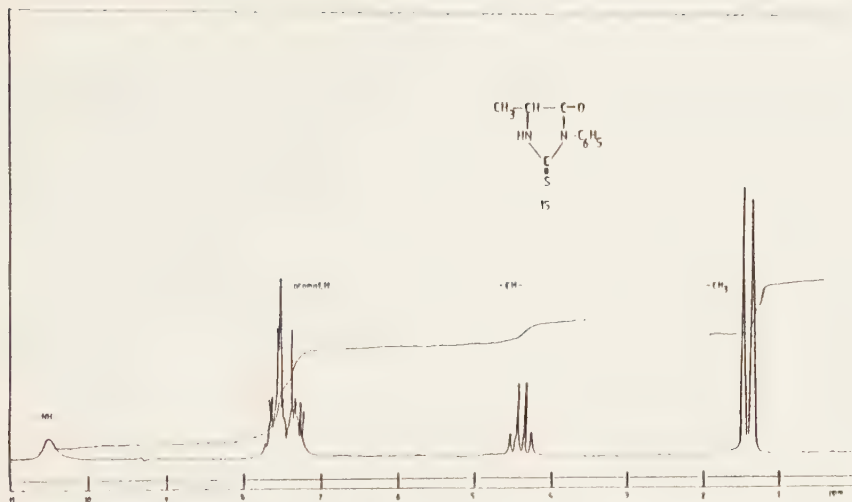


Abb. 3 90 MHz ^1H -NMR-Spektrum von PTH-Ala 15 in d_6DMSO

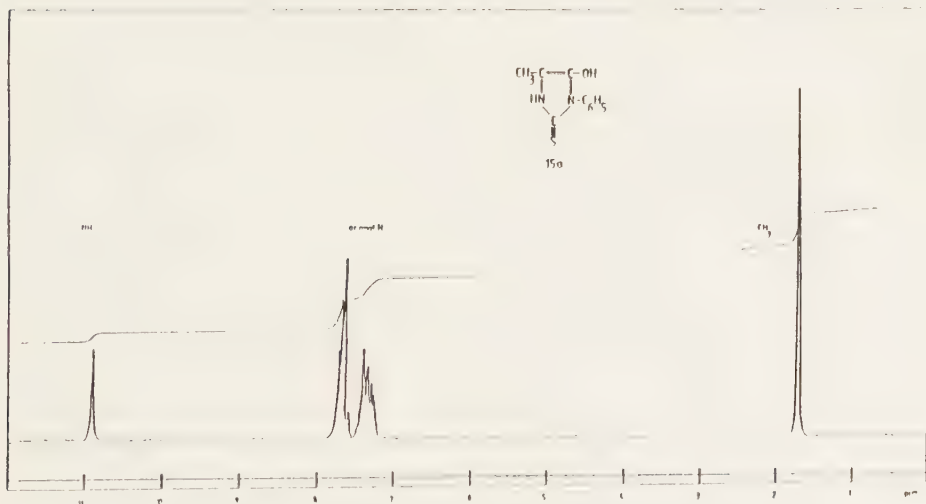


Abb. 4 90 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 3-Phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol-2-thion (15a) in d_6DMSO

sucht⁵¹⁾. In diesem Fall lassen sich die beiden tau= tomeren Formen präparativ trennen und auch nebenein= ander bestimmen. Die Umwandlung ist sowohl durch Sä= ren als auch durch Basen katalysiert.

Bei den Phenylthiohydantoinderivaten könnte die bei der Synthese zugesetzte Base einen Einfluß auf die Ausbildung der Isomeren haben. Bei der basisch kata= lysierten Enolisierung bindet die Base zunächst ein Proton. Dabei entsteht ein mit dem Enolation mesomeres Carbanion.

Statt der tertiären Base Triäthylamin wird jetzt Na= triummethylat in die Reaktion eingesetzt. Die Struk= turermittlung von Puromycin⁵²⁾ gibt einen Hinweis auf die Phenylthiohydantoinbildung im alkalischen Medium. Behandelt man nun Alaninmethylester-Hydrochlorid mit Natriummethylat und Phenylisothiocyanat in Methanol bei Raumtemperatur, so erhält man in 55%iger Ausbeute PTH-Ala 15. Der Reaktionsverlauf wird über zwanzig Stunden dünnschichtchromatographisch verfolgt, es ist aber zu keinem Zeitpunkt ein Reaktionsprodukt zu fin= den, das dem 3-Phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol-2-thion (15a) entspricht.

Rührt man dagegen PTH-Alanin mit Natriummethylat in Methanol bei Raumtemperatur, so entsteht ein weißer Niederschlag. Dieser wird dünnschichtchromatographisch im Laufmittel Chloroform/Essigsäureäthylester(9:2) als Imidazolderivat 15a identifiziert. Im Laufmittel Benzol/Aceton (5:1) erfolgt aber eine Auftrennung in zwei Komponenten, von denen eine mit 15a identisch ist. Der zweiten Komponente wird die Struktur 15b zugeord= net, was durch folgende Beobachtungen gesichert ist. Eine Anfärbung mit Ninhydrin/Collidin ist nicht mög= lich. Das Massenspektrum weist als Molekül- und Bais= peak m/e 206 aus. Aus dem Verhältnis der Bruchstücke m/e 135 (C_6H_5NCS) und m/e 136 (C_6H_5NCSH) kann man

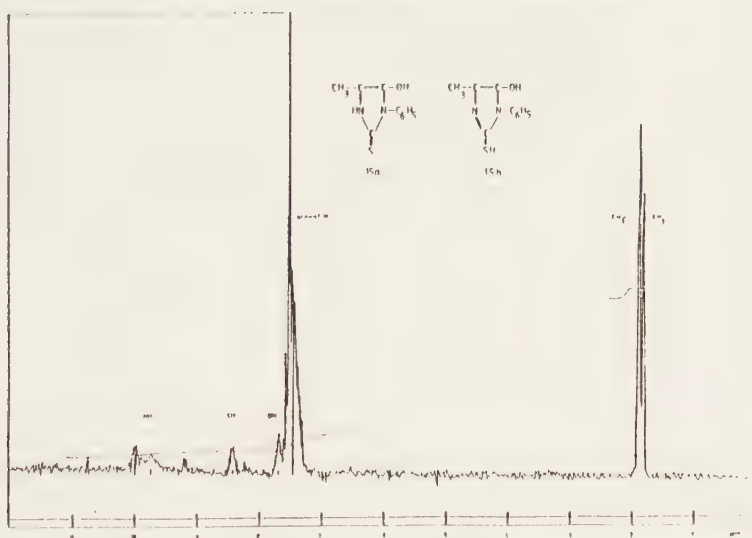


Abb. 5 90 MHz ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches 15a und 15b in d_6 Aceton

ebenfalls auf einen Anteil von 15b an dem Gemisch schließen. Im PTH-Ala 15 beträgt dieses Verhältnis 4:1 (m/e 135, 73% und m/e 136, 18 %). In 15a liegt es bei 2.7:1 (m/e 135, 30% und m/e 136, 11%). Das Gemisch 15a und 15b zeigt ein Verhältnis von 1:4 (m/e 135, 6.5% und m/e 136, 26%).

Auch das Kernresonanzspektrum (Abb. 5 und Tabelle 5) kann in diesem Sinne gedeutet werden. Aus der Integration ergibt sich, daß beide tautomeren Formen im Verhältnis 1:1 vorliegen.

Auf die Lage des Gleichgewichts bei der Keto-Enol- und Amid-Imid-Tautomerie haben verschiedene Faktoren einen Einfluß, unter anderem das Lösungsmittel und die Konzentration. So bewirken Lösungsmittel mit ge-

ringer Polarität (Hexan) und eine starke Verdünnung eine Erhöhung des Enolgehalts. Die Umlagerungsgeschwindigkeit von Enolen in aprotischen Lösungsmitteln wie trockenem Dimethylsulfoxid ist besonders gering⁵³⁾. So verändern sich PTH-Ala 15 und 3-Phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol 15a in Dimethylsulfoxid gelöst über drei Tage bei Raumtemperatur nicht. Die Substanzen werden durch Ausfällen mit Wasser unverändert zurückgewonnen.

Auch methanolische Lösungen beider Substanzen, bei denen das Methanol verdampft und die Rückstände erneut in Methanol gelöst werden, zeigen keine nennenswerten Umwandlungen von 15 in 15a oder von 15a in 15.

Wird PTH-Ala in wäßrig-methanolischer Salzsäure suspendiert und über mehrere Tage gerührt, so ist keine Ausbildung des Isomeren 15a dünnschichtchromatographisch zu erkennen. Es wird nur die Aminosäure Alanin identifiziert, was auf eine Rückspaltung durch saure Hydrolyse zurückzuführen ist⁵⁴⁾. Eine entsprechende Suspension von 15a führt auch zur Aminosäure.

PTH-Alanin löst sich in methanolischer Natronlauge sofort. Nach zehn Minuten sind in Dünnschichtchromatogrammen Substanzen mit Rf-Werten wie die des Gemisches 15a und 15b, entstanden aus PTH-Alanin mit Natriummethylat, in geringen Mengen neben anderen Hydrolyseprodukten wie der Aminosäure zu erkennen.

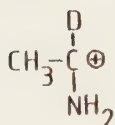
Wichtig für die Beschreibung eines Reaktionsmechanismus ist die auch beim Tyrosinmethylester-Hydrochlorid zu verfolgende Beobachtung einer ausschließlichen PTH-Bildung unter folgenden Bedingungen:

- Man löst Alaninmethylester-Hydrochlorid in einer geringen Menge Wasser.
- Unter Kühlung erfolgt die Zugabe von Triäthylamin.
- Der Ansatz wird 16 Stunden bei -18°C aufbewahrt.
- Dann gibt man Methanol dazu und die äquivalente

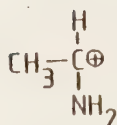
Menge Phenylisothiocyanat.

- Schon nach zehn Minuten entsteht das PTH-Alanin. Löst man dagegen Alaninmethylester-Hydrochlorid fast vollständig in Acetonitril und gibt zuerst Triäthylamin und dann Phenylsenföl dazu, dann entsteht fast ausschließlich 15a. Gibt man dagegen erst Phenylsenföl und dann Triäthylamin hinzu, so erhält man ein Gemisch von PTH-Ala und 15a.

Die folgenden Versuche zeigen, daß das Proton am C5 des Thiohydantoinrings während der Reaktion von Aminosäuremethylester-Hydrochlorid mit Triäthylamin und Phenylsenföl ausgetauscht wird. Als Lösungsmittel werden Deuteriumoxid und Deuteromethanol verwendet. Mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie sind die folgenden Aussagen möglich. Löst man Alaninmethylester-Hydrochlorid in Deuteriumoxid bei 0°C und gibt Triäthylamin dazu, läßt den Ansatz für 18 Stunden bei -18°C stehen und nach Methanolzugabe mit Phenylsenföl reagieren, so findet man im entstandenen PTH-Ala 65% C5-H und 35% C5-D. Wird der Versuch nur in Deuteromethanol bei -18°C angesetzt, so verringert sich der Anteil an C5-H auf 43%. Eine weitere Abnahme ist zu beobachten, wenn man in Deuteromethanol bei Raumtemperatur arbeitet. Der Anteil an C5-H beträgt nur noch 35%. Um die Frage zu beantworten, ob die tertiäre Base einen Einfluß auf die Racemisierung hat, wird der freie Alaninmethylester für 18 Stunden bei -18°C in Deuteromethanol aufbewahrt und anschließend mit Phenylsenföl umgesetzt. Das Kernresonanzspektrum zeigt auch jetzt nur einen Anteil an C5-H von 40%. Das Massenspektrum des Esters weist aus, daß die Deuterierung schon am α -C-Atom des Aminosäureesters eingetreten ist, denn es werden die Molpeaks $M^+ 103$ und $M^+ 104$ im Verhältnis von ca. 1:1 gefunden. Noch charakteristischer ist die Betrachtung der Fragmentionen $m/e 44$ und $m/e 45$. In Deuterometha-



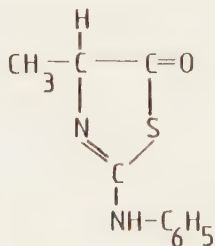
18 m/e 45



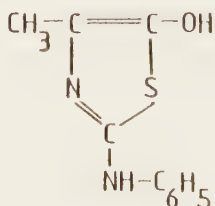
19 m/e 44

nol findet man für m/e 45 16% rel.Int. und für m/e 44 100%, während es in Methanol nur 4% für m/e 45 sind.

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Beobachtungen zeigen alle die außerordentlich leichte Beweglichkeit des C5-Protons am Thiohydantoinring. Bei Mechanismusuntersuchungen des Phenylisothiocyanat=abbaus von Peptiden beschreibt Edman⁵⁵⁾ das Entstehen eines Thiazolinons 20 aus dem Phenylthiocarbamylpeptid. Das Thiazolinon wird in nicht wäßrigen Lösungen in das entsprechende PTH-Derivat umgelagert und in wäßrigen Lösungen in die Phenylthiocarbamyl-Aminosäure zurückverwandelt, die dann zum PTH-Derivat zyklisiert. Die Bildung des Thiazolinon-Derivats 20 oder seines Isomeren 20a in Methanol unter Einwirkung von Triäthylamin und Phenylsenföhl auf die Aminosäuremethylester-Hydrochloride ist als Endprodukt auszuschließen.



20

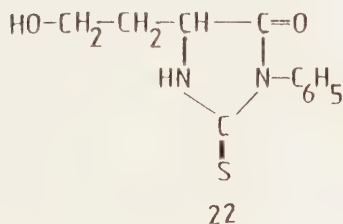
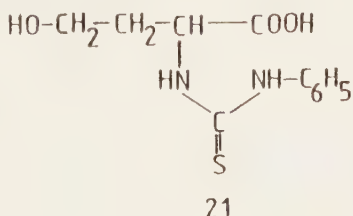


20a

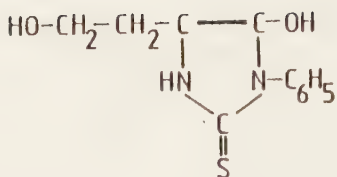
Substanz 15a wird in Gegenwart von Wasser nicht hydrolysiert zum Phenylthiocarbamylalanin, das dann zum

PTH-Alanin zyklisieren sollte. Wird 15a wie beim Edman-Abbau von Peptiden mit Trifluoressigsäure und anschließend mit Salzsäure behandelt, so zeigt sich ebenfalls keine Veränderung der Substanz im dünn-schichtchromatographischen Verhalten.

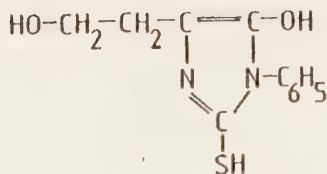
Bei der Synthese von PTH-hSer 22 aus der freien Aminosäure (Methode C) kann das Phenylthiocarbamyl-homoserin 21 in guter Ausbeute als weiße Kristalle mit dem Schmp. 164°C gefaßt werden.



Hingegen erhält man bei der Umsetzung des Homoserin-methylester-Hydrochlorids mit Phenylsenföl und Triäthylamin in methanolischer Lösung (Methode B) die Isomeren 22a und 22b. Das Gemisch 22a,b hat einen Zersetzungspunkt von 239°C. Nach dem Massenspektrum müssen Isomere mit dem MG 236 vorliegen. Der wesentliche Unterschied in den Massenspektren von 22, 22a und 22b besteht darin, daß das Verhältnis der Ionen bei m/e 135 und m/e 136 für PTH-hSer 3:1 und für 22a



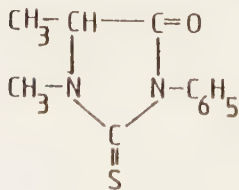
22a (MG 236)



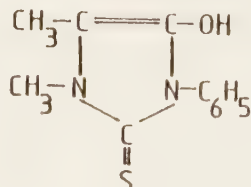
22b (MG 236)

und 22b jedoch 2:1 beträgt.

Analog isoliert man bei der Synthese von PTH-N-Methylalanin nach Methode B neben 23 durch HPLC-Trennung das Isomere 23a. 23a geht beim Stehen in Chloroform oder Dimethylsulfoxid in 23 über. Diese Umwandlung konnte mit 15a,b und 22a,b nicht beobachtet werden. Die Isolierung von 23a zeigt, daß der Wasserstoff am N1 des Phenylthiohydantoinrings für die Bildung der Isomeren 15a und 22a nicht notwendig ist.



23



23a

1.2.2.4.1 ¹H-NMR-Spektren

Die Spektraldaten stützen die oben gegebenen Strukturvorschläge für 15a und 15b, 22a und 22b und 23a. Die chemischen Verschiebungen der untersuchten PTH-Aminosäuren und ihrer isomeren Derivate sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die NH-Protonen in den PTH-Derivaten liegen im Verschiebungsbereich von Thiosäureamiden bei $\delta = 10.45-10.56$ ppm, während in den Isomeren das NH-Signal bei $\delta = 10.9-10.94$ ppm zu finden ist. Das C5-

Tabelle 5 Chemische Verschiebungen δ (ppm) einiger PTH-Aminosäuren und der isomeren Derivate (90 MHz, TMS intern = 0 ppm)

PTH-Aminosäure	Lösungsmittel	NH 1H	C ₆ H ₅ SH	C5 H 1H	C4 OH	C2 SH	Aminosäureseitenkette an C5
hSer	DMSO	10.47	7.23-7.43	4.46	-	-	HO CCH ₂ - -CH ₂ - 4.7 (1H) 3.62 (2H) 2.02 (2H)
22a + 22b	DMSO	10.9 (1/3H)	7.23-7.43	-	10.66 (3/6H)	10.66 (1/6H)	4.81 (1H) 3.53 (2H) 2.33 (2H)
Ser	DMSO	10.45	7.3 -7.4	4.44	-	-	5.32 (1H) 3.79 (2H)
Thr	DMSO	10.54	7.26-7.45	4.29	-	-	CH -CH ₃ 5.23 (1H) 4.10 (1H) 1.26 (3H)
Ala	DMSO	10.56	7.27-7.44	4.46	-	-	1.40 (3H)
15a	DMSO	10.9	7.27-7.6	-	-	-	1.68 (3H)
15a + 15b	DMSO		7.27-7.6				1.65 + 1.69 (3H, 1:1)

Fortsetzung Tabelle 5

PTH-Aminosäure	Lösungsmittel	NH 1H	C ₆ H ₅ 5H	C5 H 1H	C4 OH (0.5H)	C2 SH (0.5H)	Aminosäureseitenkette an C5
15a +15b	Aceton	9.73	7.44	-	7.7 (0.5H)	8.43 (0.5H)	-CH ₃ 1.84 + 1.87 (3H, 1:1)
N-Methyl- -Ala 23	DMSO	N-CH ₃ 3.28 (3H)	7.44	4.48	-	-	1.50 (3H)
23a	DMSO	3.26 s, 3H	7.21-7.49 m, 5H	3.99 q, 1H	5.60* d, 1H	1.17 d, 3H	1.47 s, 3H
23a	CDCl ₃	3.40 s, 3H	7.33-7.53 m, 5H	4.16 q, 1H	1.87* d, 1H	1.33 d, 3H	1.60 s, 3H

*Austausch mit D₂O

Proton, das Methinproton im Thiohydantoinring, zeigt je nach Aminosäureseitenkette ein Resonanzsignal zwischen $\delta = 4.29$ ppm im PTH-Thr und $\delta = 4.46$ ppm im PTH-Ala. In den Isomeren und den Isomerengemischen fehlt dieses Signal. Dafür wird im Isomerengemisch 15a,b in Aceton jeweils ein Resonanzsignal für das OH am C4 bei $\delta = 7.7$ ppm und für das SH am C2 des Thiohydantoinrings bei $\delta = 8.43$ ppm gefunden. Einen weiteren Hinweis auf die Ausbildung von Doppelbindungen zeigen die Protonen der Aminosäureseitenkette, die dem C5 benachbart sind. Sie werden nach tieferem Feld verschoben. So ist die Methylgruppe im PTH-Ala bei $\delta = 1.40$ ppm als Duplett zu finden, im Isomeren 15a tritt dieses Signal bei $\delta = 1.68$ ppm auf. Für das Isomerengemisch 15a,b erhält man zwei Singuletts im Verhältnis 1:1 bei $\delta = 1.65$ ppm und $\delta = 1.69$ ppm. Dieses Ergebnis ist auch beim PTH-hSer zu finden. Die Methylengruppe hat im PTH ihr Resonanzsignal bei $\delta = 2.02$ als Multipllett. Das Signal wird im Isomerengemisch nach $\delta = 2.33$ ppm verschoben. Diese Ergebnisse deuten auf eine Isomerisierung.

Im N-Methyl-PTH-Ala 23 ist das Stickstoffproton der PTH-Aminosäure durch eine Methylgruppe ersetzt. Diese zeigt im NMR-Spektrum ein Resonanzsignal bei $\delta = 3.28$ ppm. Die Methylgruppe der Aminosäureseitenkette weist ein Duplett bei $\delta = 1.50$ ppm aus. Das C5-Proton des Thiohydantoinrings liegt bei $\delta = 4.48$ ppm. Es gelingt zwar, die isomere Verbindung 23a durch HPLC zu isolieren, aber da eine Umwandlung von 23a in 23 in den Lösungsmitteln Chloroform und Dimethylsulfoxid erfolgt, sind die NMR-Daten nicht überzeugend zuzuordnen wie Tabelle 5 zeigt.

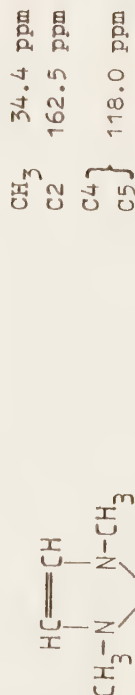
1.2.2.4.2 ^{13}C -NMR-Spektren

In Tabelle 6 sind die ^{13}C -NMR-Spektraldaten einiger

Tabelle 6 ^{13}C -NMR-Spektren von PTH-Ala, N-Methyl-PTH-Ala und der isomeren Derivate
(TMS = 0 ppm)

Substanz	Lösungs- mittel	CH_3	$\text{CH}_3\text{-N}$	C5	C4	C2	N-C	Aromaten C meta-C para-C
PTH-Ala	DMSO	16.2	-	55.0	175.0	182.3	134.0	128.8 128.6
15a	DMSO	17.2	-	65.9	172.9	182.3	133.0	128.8 128.6
15a+15b	DMSO	17.2	-	65.9	172.9	182.0	133.0	128.7
N-Methyl-	DMSO	16.6	-	67.4	173.5	173.5		
		14.5	31.9	59.5	173.7	181.0	134.0	128.7

zum Vergleich: 1,3-Dimethylimidazol-2-thion 24 (in DMSO)



CH_3 34.4 ppm
 C2 162.5 ppm
 C4 } 118.0 ppm
 C5 }

24

PTH-Aminosäuren angegeben. Mit diesen Daten sollte es möglich sein, die Doppelbindung zwischen den Atomen C4 und C5 im Thiohydantoinring zu sehen. Normalerweise werden C=C-Doppelbindungen im Bereich von $\delta_{\text{TMS}} = 100$ ppm gefunden. Für Ketene liegt dieses Signal jedoch bei $\delta_{\text{TMS}} = 2.5$ ppm. Wie aus Tabelle 6 zu erkennen ist, erscheint das Resonanzsignal des C5 im PTH-Ala bei $\delta = 55.0$ ppm, im Isomeren 15a ist nach tieferem Feld verschoben zu $\delta = 66.0$ ppm, während im Isomerengemisch 15a,b zwei Signale zu finden sind bei $\delta = 66.0$ ppm und $\delta = 67.0$ ppm. Der Carbonylkohlenstoff C4 hat im PTH-Ala den δ -Wert 175.0 ppm. Im Isomeren 15a ist eine Verschiebung zu $\delta = 172.9$ ppm eingetreten. Für das Gemisch 15a,b bleibt der Wert bei $\delta = 172.9$ ppm. Damit ist eine Doppelbindung wahrscheinlich. Der Thiocarbonylkohlenstoff C2 verändert sein Resonanzsignal nur geringfügig und bestätigt damit, daß dieser Teil des Moleküls in die Isomerisierung zu 15a, 22a und 23a nicht einbezogen ist. Im symmetrischen 1,3-Dimethylimidazol-2-thion (24) beobachtet man die Resonanzen der C-Atome 4 und 5 bei $\delta = 118$ ppm. Auch dieses Ergebnis stützt die Annahme einer Doppelbindung in den Isomeren 15a, 22a und 23a. Auch die Verschiebung des Kohlenstoffs der Aminosäures Seitenkette läßt auf einen Doppelbindungscharakter schließen. Im PTH-Ala liegt dieses Signal bei $\delta = 16.2$ ppm, während es in den Isomeren nach $\delta = 17.2$ ppm und $\delta = 16.6$ ppm verschoben ist.

1.2.2.4.3 UV-Spektren

In Abbildung 6 sind die Ultraviolettabsorptionskurven für einige Phenylthiohydantoinderivate und das 1,3-Dimethylimidazol-2-thion 24 dargestellt. Das Absorptionsmaximum liegt für 24 bei 259 nm. Im Methyl-PTH-Ala ist es bei 267 nm zu finden, so wie es für fast alle PTH-Aminosäurederivate der Fall ist. Im Isomeren 15a

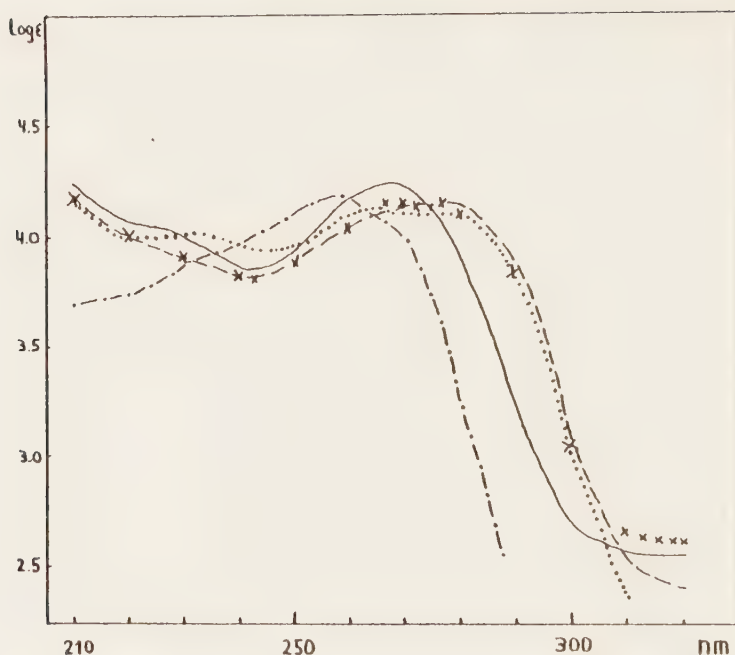


Abb. 6 UV-Spektren von 15; 15a; 15a,b; 23 und 24

- PTH-Ala 15
- 15a
- xx 15a,b
- ... N-Methyl-PTH-Ala 23
- .- 1.3-Dimethylimidazol-2-thion 24

beobachtet man eine bathochrome Verschiebung nach 277 nm. Diese bathochrome Verschiebung ist durch den mit der Einführung der Doppelbindung verbundenen Energiegewinn verständlich. Auch für die Gemische 15a,b und 22a,b ist diese Verschiebung zu finden.

1.2.2.4.5 IR-Spektren

Qualitative⁵⁶⁾ und quantitative⁵⁷⁾ Infrarot-spektroskopische Untersuchungen von PTH-Aminosäuren liegen

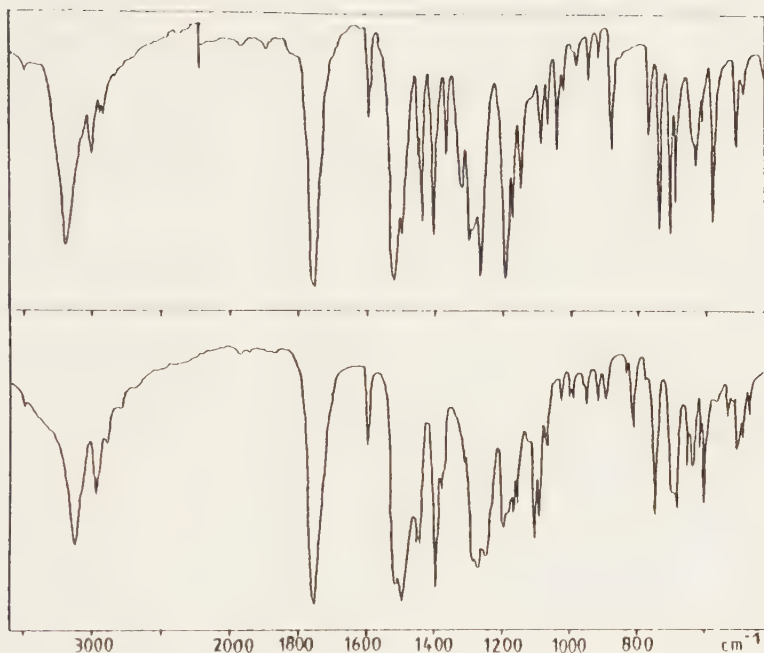


Abb. 7 oben IR-Spektrum von PTH-Ala (KBr)
 unten IR-Spektrum des Isomeren 15a (KBr)

schon vor. Sie dienten vor allem zur Identifizierung der N-terminalen Reste von einfachen Peptiden nach dem Edman-Abbau. Beide Autoren geben in Übereinstimmung die charakteristischen Banden von PTH-Aminosäuren wie folgt an:

- | | |
|----------------------------|------------------------------------|
| 1770-1740 cm^{-1} | für die Ring-C=O Schwingung |
| 1600 cm^{-1} | für die Phenylgruppenschwingung |
| 1425-1400 cm^{-1} | für die C=S Schwingung |
| 3300-3150 cm^{-1} | für die N-H Schwingung |
| 1530-1500 cm^{-1} | |
| 1350-1340 cm^{-1} | für die S=C=N Schwingung |
| 1200-1190 cm^{-1} | für die C-N Deformationsschwingung |

Die Infrarot-Spektren von PTH-Ala 15 und dem Isomeren

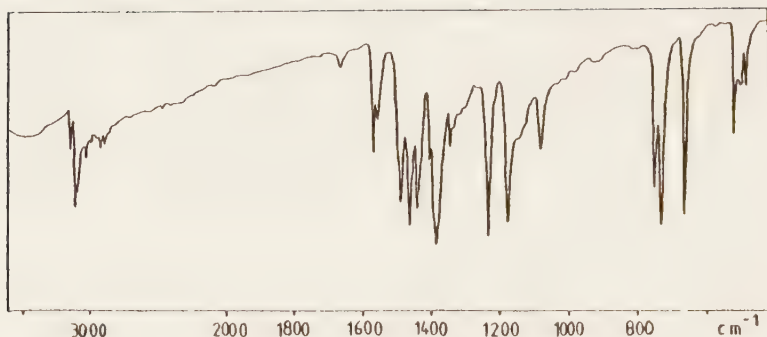


Abb. 8 IR-Spektrum von 1.3-Dimethylimidazol-2-thion
24 (KBr)

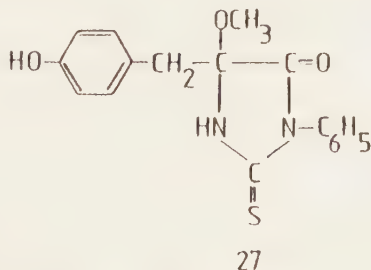
15a sind in Abbildung 7 dargestellt. Sie zeigen nur geringfügige Unterschiede. So ist die NH-Bande, die beim PTH-Ala 15 bei 3120 cm^{-1} liegt, im Isomeren 15a nach 3180 cm^{-1} verschoben. Im Carbonylbereich beobachtet man für PTH-Ala und das Isomere jeweils eine intensive Bande bei 1750 cm^{-1} . Dieses Ergebnis ist überraschend und stützt die oben angenommene Isomerisierung $15 \rightleftharpoons 15a$ und $22 \rightleftharpoons 22a$ nicht. Da im IR-Spektrum von 1.3-Dimethylimidazol-2-thion (Abbildung 8) eine Bande in diesem Bereich fehlt, ist auszuschließen, daß die Bande bei 1750 cm^{-1} in 15a einer Thiocarbonylgruppe (Ringspannung) zuzuordnen ist.

Auch die Möglichkeit einer Ketenstruktur ist auszuschließen, denn in diesem Fall sollte man eine starke Bande bei $\sim 2150\text{ cm}^{-1}$ für das $\text{C}=\text{C}=\text{O}$ Strukturelement finden.

Da die IR-Spektren der Isomeren 15a und 22a nur in KBr aufgenommen werden können, ist der Vergleich mit den in Lösung erhaltenen NMR-Spektren nur bedingt möglich. Weitere Untersuchungen wie Photoelektronenspektren (in Lösung) bzw. Röntgenstrukturanalyse (in festem Zustand) müssen zur Klärung herangezogen werden.

1.2.2.5 Tyrosin

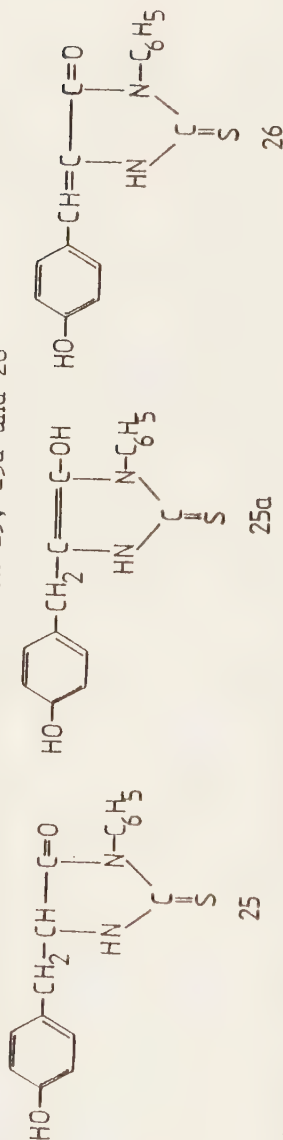
Bei Tyrosinmethylester-Hydrochlorid, umgesetzt mit Phenylisothiocyanat und Triäthylamin in methanolischer Lösung, ergibt sich innerhalb einer Stunde eine starke Gelbfärbung des Reaktionsansatzes. Mit dünnschichtchromatographischen Untersuchungen lassen sich drei Reaktionsprodukte erkennen. Eines davon ist als Phenylthiohydantoinderivat zu identifizieren. Massenspektrometrische Untersuchungen geben weiteren Aufschluß über die beiden anderen Produkte. So findet man neben $M^+ 298$ (= PTH-Tyr 25) noch $M^+ 296$ und $M^+ 328$. Daraus kann auf Grund der bei Schäfer⁴⁹⁾ beschriebenen Ergebnisse geschlossen werden, daß die Substanz mit dem Molekülpeak $M^+ 296$ das Dehydrierungsprodukt 5-p-Hydroxybenzyliden-3-phenylthiohydantoin 26 ist und die Substanz mit dem Molekülpeak $M^+ 328$ das Methanoladditionsprodukt 5-Methoxy-5-p-hydroxybenzyl-3-phenylthiohydantoin 27.



Säulenchromatographische Auftrennung der Komponenten an mit 10% Wasser desaktivierten Kieselgel und Chloroform/Essigsäureäthylester (1:1) als Laufmittel und anschließende spektroskopische Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse.

Wird der oben beschriebene Ansatz nach 24stündigem Stehen bei Raumtemperatur unter Schütteln mit einigen Tropfen Wasser versetzt, so fällt ein hellgelber Nie-

Tabelle 7 $^1\text{H-NMR}$ -Spektraldaten der Substanzen 25, 25a und 26



Die Spektren wurden in d_6 DMSO gemessen

Substanz	NH 1H	N-Aromat C_6H_5	C4-OH 1H	C5-H 1H	C6-H ₂ 2H	C6-H 1H	p-OH 1H	Aminosäurearomat ortho-H meta-H
PTH-Tyr	10.5	7.4 (3H) 6.85 (2H)	-	4.70	3.03	-	9.28	7.02 (2H) 6.71 (2H)
25a	11.05	7.40 (3H) 6.6 (2H)	-	-	3.42	-	9.42	7.06 (2H) 6.72 (2H)
26	12.43	7.45 (5H)	-	-	-	6.64	10.11	7.71 (2H) 6.85 (2H)

derschlag, das 3-Phenyl-4-hydroxy-5-p-hydroxybenzyl=imidazol-2-thion (25a) aus. Wieder ist der Rf-Wert von PTH-Tyr verschieden und die Substanz nicht mit Ninhydrin/Collidin anfärbbar. Die in Tabelle 7 angegebenen ^1H -NMR-Spektren zeigen signifikante Unterschiede und sichern die Struktur von 25a. So findet man im PTH-Tyr das C5-H Protonensignal als Triplett bei $\delta = 4.70$ ppm. Dieses Signal fehlt in 25a und 26. Man kann diese beiden Substanzen aber durch die Protonenresonanz am C6 unterscheiden. Im PTH-Tyr findet man für die Methylen=gruppe ein Duplett bei $\delta = 3.03$ ppm. Bei 25a verschiebt sich das Signal nach $\delta = 3.42$ ppm und wird zum Singulett. Für das 5-p-Benzyliden-3-phenylthiohydantoin 26 ist noch eine größere Verschiebung zu erwarten. Das Methinproton geht eine Long-range-Kopplung mit den Aromatenprotonen ein. Der entsprechende δ -Wert ist bei 6.64 ppm zu finden. Auch für die Aromatenprotonen ergeben sich unterschiedliche Werte. In 25a haben die ortho-Protonen ihre Resonanz bei $\delta = 7.06$ ppm, die meta-Protonen bei $\delta = 6.72$ ppm. Für 26 beobachtet man die ortho-Protonen bei $\delta = 7.71$ ppm. Es tritt Kopplung mit dem Methinproton ein. Die meta-Protonen liegen bei $\delta = 6.85$ ppm.

Die UV-Spektren von PTH-Tyr und dem Isomeren 25a zeigt Abbildung 9. Deutlich ist die Verschiebung des Absorptionsmaximums nach längeren Wellenlängen zu erkennen. Für 25 ist λ_{max} bei 270 nm zu finden, für 25a bei 277nm und das 5-p-Hydroxybenzylidenderivat 26 zeigt drei Absorptionsmaxima bei 253.5 nm, 299 nm und 395nm.

Wichtig für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus ist folgende Beobachtung. Die Ausbildung von 25a erfolgt in geringer Ausbeute nur, wenn man Tyrosinmethylester-Hydrochlorid in Methanol löst und dann Triäthylamin und Phenylsenföl hinzugibt. Löst man dagegen das Hydrochlorid erst in einer geringen Menge Wasser

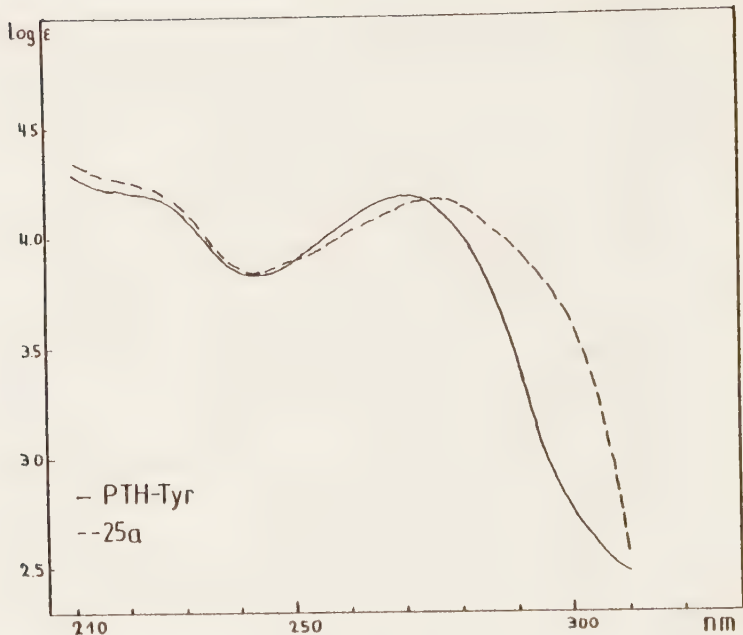


Abb. 9 UV-Spektren von PTH-Tyr 25 und dem Isomeren 25a in Äthanol

unter Kühlung, gibt dann die stöchiometrische Menge Triäthylamin hinzu und bewahrt den Ansatz bei -18°C auf⁵⁸⁾, so kann man, wenn das entsprechende Volumen an Methanol und Phenylsenföl zugegeben wird, nach 24 Stunden durch Ausfällen mit Wasser nur das PTH-Derivat erhalten.

1.2.3 Identifizierung mit Hilfe der Hochleistungs= runddünnschichtchromatographie (HPRDC)

Die Dünnschichtchromatographie von PTH-Aminosäuren wurde bisher auf 0.25 mm starken Kieselgel/Zinksilikatschichten aufsteigend durchgeführt⁵⁹⁾. In der Regel werden zwei Platten benutzt, eine für die Chro=

matographie in System H (1.2-Dichloräthan/Eisessig 60:40)⁴⁶⁾ für die Entwicklung der mehr polaren Aminosäurederivate und eine in System D (Xylol/Formamid)⁴⁶⁾, um PTHs mit sehr ähnlicher Wanderungsgeschwindigkeit zu entwickeln wie Isoleucin und Leucin oder Valin und Phenylalanin. Die Entwicklung der Chromatogramme dauert 1.5 bis 2 Stunden in allen Lösungsmittelsystemen⁶⁰⁾. Der Gebrauch von Polyamidplatten⁶¹⁾ hat die Empfindlichkeit auf 0.05 bis 0.2 nmol gesteigert. HPDC-Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ sind 10-20 fach empfindlicher als gewöhnliche Kieselgelplatten und bieten die gleiche Empfindlichkeit wie Polyamidplatten⁶²⁾.

In der Hochleistungs-runddünn-schichtchromatographie werden jetzt die große Empfindlichkeit der HPDC-Platten mit hoher Trennschärfe (denn statt der DC-Flecken bei der normalen Chromatographie tritt bei der Rundchromatographie eine scharfe Kreislinie auf) und kurzer Laufzeit (die Chromatogramme lassen sich in weniger als fünf Minuten entwickeln) vereinigt. Auch der Fließmittelbedarf ist äußerst gering (0.07 bis 0.25 ml)⁶³⁾. Ein weiterer Vorteil gegenüber der linearen Dünn-schichtchromatographie ist, daß die Rund-DC die etwa 10-fache Substanzbelastung verkraftet und damit den Nachweis einer Substanzspur um diesen Faktor steigert. Dies ist für den Edman-Abbau von Bedeutung, denn wegen unvollständiger Reaktion bei vorangegangenen Abbauschritten finden sich in der Regel mehrere PTH-Aminosäuren, von denen eine zweifelsfrei als Hauptbestandteil erkennbar sein muß.

Es werden PTH-Gemische auf ihre Trennbarkeit mittels der HPRDC untersucht. Die Chromatogrammentwicklung ist normal ("Trockendosierung") auf HPDC-Platten 50x50 mm⁶³⁾. Der Durchmesser des Kreises, auf dem die Startpunkte zu liegen kommen, ist sechs mm. Als Laufmittel werden verwendet:

Chloroform p.A./Essigsäureäthylester (9:1) bei einer Dosierung von 1.0 sec/ 1⁶²⁾,

Chloroform p.A./Äthanol/Essigsäure (9:1:0.1) bei einer Dosierung von 1.2 sec/ 1⁶⁰⁾ und

n-Hexan/Propionsäure/1.2-Dichloräthan (5.8:1.7:2.5) bei einer Dosierung von 1.2 sec/ 1⁶⁰⁾.

Dabei legt die Lösungsmittelfront eine Laufstrecke von 23 mm vom Kreismittelpunkt aus zurück.

Wichtig ist die Anfärbung nach Roseau und Pantel⁴⁹⁾, denn so können PTH-Derivate, die sehr dicht beieinanderliegen, auf Grund ihrer Farbigkeit eindeutig identifiziert werden, wie in der Diskussion der Ergebnisse aus Tabelle 8 zu sehen sein wird.

Im Laufmittel C ordnen sich die PTH-Aminosäuren wie folgt an: His, Asn und Gln, Ser und CM-Cys, Asp und hSer und Thr, Glu und Lys, Gly, Trp, Hypo, Ala, Met, Phe, Pro, Ile, Leu. Auf Grund der Anfärbung können Asn (hellgelb) und Gln (braungrün) unterschieden werden. Ebenso sind Asp (rosa) und hSer (gelb) zu erkennen und auch Glu (braun) und Lys (farblos). Nicht zu identifizieren sind Ser (rotviolett) von CM-Cys (rotviolett). Auch hSer und Thr, beide färben sich gelb, sind in diesem Laufmittel nicht zu trennen. Nicht immer eindeutig sind Ile und Leu voneinander zu unterscheiden, in Zweifelsfällen empfiehlt es sich, neben einem bekannten PTH-Gemisch auch die einzelne PTH-Aminosäure mitlaufen zu lassen. Eine weitere Identifizierungshilfe bietet auch die Zeit, nach welcher die Farbe erscheint⁴⁹⁾. Im Laufmittel A ist die Reihung nur für Thr, Lys und Hypo, Tyr, Gly, Trp, Ala, Met, Phe, Val, Leu, Ile und Pro eindeutig. Erst in B werden His, Asn, Gln, CM-Cys, Ser, Asp, Glu, hSer entwickelt. Sie zeigen in A fast keine Beweglichkeit.

Die Anwendung aller drei Laufmittel bietet eine Möglichkeit, innerhalb kurzer Zeit eine Information über

Tabelle 8 Entwicklung der HPRDC-Chromatogramme von Phenylthiohydantoinen

Aminosäure Laufstrecke*				Aminosäure Laufstrecke*			
Laufmittel				Laufmittel			
	A	B	C		A	B	C
Ala	11	16	9	Lys	8	16.5	4
Asn	2	10	1	Met	12	20	11
Asp	3	15.5	3	Phe	12.5	16	12
CM-Cys**	2	12	2	Pro	17	18.5	13
Gln	2.5	11	1	Ser	4.5	12.5	2
Glu	2.5	14	4	hSer	4.5	17	3
Gly	10	15.5	6.5	Thr	6	15.5	3
His	-	4.5	-	Trp	10.5	16	7
Hyp	8	18	7.5	Tyr	9	19.5	5
Ile	17	21	16.5	Val	14	21	14
Leu	16.5	21	17				

A Chloroform/Essigsäureäthylester 9:1

B Chloroform/Äthanol/1.2-Dichloräthan 9:1:0.1

C n-Hexan/Propionsäure/1.2-Dichloräthan 5.8:1.7:2.5

** Carboxymethylcystein

* Es wird die Laufstrecke in mm vom Auftragsort angegeben. Den Werten in B ist eine Entwicklung in A vorausgegangen.

die während der Sequenzierung erhaltenen PTH-Aminosäuren zu bekommen.

1.3 Anwendung auf die Sequenzierung

Die im Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Syntheseprodukte von ¹⁵N-Phenylthiohydantoinaminosäuren und die dabei auftretenden Besonderheiten des Abschnitts 1.2.2.4 werden im Folgenden in Bezug auf die Sequenzierung

von Peptiden nach Edman untersucht.

1.3.1 Abbau zweier Alanin enthaltender Dipeptide

Wie bei der Darstellung von PTH-Alanin aus Alaninmethylester-Hydrochlorid, Triäthylamin und Phenylisothiocyanat gezeigt wird, hat die zugesetzte Base einen Einfluß auf das Ablösen des C5 Protons im Thiohydantoinring. Die Kopplung der aminoendständigen Aminosäure im Peptid oder Protein wird ebenfalls im basischen Milieu durchgeführt⁶⁴). Dabei wird das Peptid in Pyridin/Wasser (1:1) gelöst oder suspendiert. Dann wird mit der Base Dimethylallylamin auf 0.4molar verdünnt und der Ansatz mit wäßriger Trifluoressigsäure auf pH 9 eingestellt. Jetzt wird das Reagenz Phenylsenföf zugesügt. Nach einer Stunde bei 40°C ist die Kopplung beendet. Die Spaltung des entstandenen N-Phenylthioharnstoffderivats zum Thiazolinonprodukt und die Umwandlung zum Aminosäurephenylthiohydantoin erfolgt mit Trifluoressigsäure und 1 n Salzsäure. Da die in Abschnitt 1.2.2.4 diskutierten Produkte gegen Säure unempfindlich sind, sollte man bei Alanin enthaltenden Peptiden und Proteinen möglicherweise im Dünnschichtchromatogramm das isomere Produkt nach dem Abbau mit Phenylisothiocyanat finden. Zu diesem Zweck werden zwei Dipeptide, Alanylmethionin und Alanylphenylalanin, einem Abbau unterworfen und die Entstehungsprodukte dünnschichtchromatographisch untersucht. In beiden Fällen ist nur das Phenylthiohydantoin von Alanin nachzuweisen. Auch bei der Verwendung von Triäthylamin an Stelle von Dimethylallylamin zur Verdünnung wird nach vollzogenem Edmanabbau nur PTH-Alanin gefunden. Beim Abbau von Dipeptiden mit Phenylisothiocyanat bei pH 9 ist die Entstehung enolischer Produkte wie in Abschnitt 1.2.2.4 nicht nachzuweisen.

2. Dipeptidylaminopeptidase I

Eine interessante Methode zur Bestimmung der Aminosäuresequenz von Polypeptiden ist der Abbau in Dipeptidfragmente mit Dipeptidylaminopeptidase I. Dieses Enzym ist in der Literatur unter den verschiedensten Namen zu finden, in denen sich seine Eigenschaften widerspiegeln

- Cathepsin C⁶⁵⁾
- Dipeptidyltransferase⁶⁶⁾
- Dipeptidylpeptidhydrolase⁶⁷⁾

DAP I ist ein lysosomales SH-Enzym. Es spaltet nacheinander Dipeptide vom unsubstituierten Aminoende aus Proteinen und Peptiden⁶⁵⁻⁶⁹⁾. Bekannt ist ferner die Spaltung von Dipeptidamiden⁶⁵⁾, ⁶⁷⁾, ⁶⁸⁾, -estern⁶⁸⁾, - β -naphthylamiden⁷⁰⁾ und -p-nitroaniliden⁷¹⁾. Diese Spaltungen finden bevorzugt im schwach sauren pH-Bereich statt. Daneben besitzt das Enzym eine hohe Transpeptidase-Aktivität. Bei Werten um pH 8 werden Polypeptide aufgebaut⁶⁹⁾, ⁷²⁾. Dies erklärt auch den Namen Dipeptidyltransferase bei einigen Autoren⁶⁵⁾. Für uns ist DAP I auf Grund der Dipeptidylpeptidhydrolaseaktivität interessant, denn es kann eine Methode zur Peptidsequenzierung erarbeitet werden.

2.1 Isolierung und Anreicherung von DAP I

Cathepsin C kann aus verschiedenen tierischen Geweben wie Rindermilz⁶⁵⁾ oder Rattenleber¹⁸⁾, ⁷³⁾ angereichert werden.

Das Isolierungsverfahren entspricht in der Folge der Anreicherungs-schritte zum großen Teil den Reinigungsprozeduren, die von Metrione, Neves und Fruton⁶⁵⁾ vorgeschlagen wurden.

Von frischer Rindermilz wird die Haut abgezogen. Das Gewebe wird in kleine Streifen geschnitten und zweimal

durch einen Fleischwolf gedreht. Aus dem so zerkleinerten Material wird ein saurer Extrakt hergestellt. Dieser wird zwei Ammonsulfatfällungen unterworfen (45 und 70%). Der Niederschlag der 70%igen Ammonsulfatfällung wird in Wasser aufgenommen und gegen 0.9% Natriumchlorid dialysiert. Die so erhaltene 45-70 Ammonsulfatfraktion wird in der Hitze behandelt. Es folgen noch eine Ultrazentrifugation und zwei Säulenchromatographieschritte am Molekularsieb Sepharose 6 B-C.L. und dem Ionenaustauscher CM-Cellulose. Die Anreicherung wird durch Messung der Proteinkonzentration und der Hydrolyseaktivität kontrolliert. Protein wird mit der Biuretmethode nach Beisenherz et al.⁷⁴⁾ und teilweise durch Absorptionsmessung bei 280 und 260 nm nach Warburg und Christian⁷⁵⁾ bestimmt. Die Hydrolyseaktivität wird mit Gly-Phe- β -naphthylamid als Substrat bestimmt¹⁸⁾, indem das freiwerdende β -Naphthylamin gemessen wird. Dies zeigt eine Fluoreszenzemission bei 410 nm, wenn es bei 335 nm angeregt wird.

Weitere Einzelheiten des Anreicherungsverfahrens sind im experimentellen Teil zu finden.

Tabelle 9 zeigt das Ergebnis einer Anreicherung von Dipeptidylaminopeptidase I. Die maximale spezifische Aktivität wurde in diesem Versuch bei einer 660 fachen Anreicherung erzielt. Dies bedeutet eine 7 fache Steigerung gegenüber der in der Literatur⁶⁵⁾ beschriebenen. Enzym dieser spezifischen Aktivität konnte nach 50%igem Glycerinzusatz bei -18°C mehrere Monate unter geringfügigem Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Zum Zeitpunkt der Anreicherungsversuche wurde das Enzym von der Firma Boehringer auf den Markt gebracht. Eine zur Verfügung gestellte Probe von 20 E wurde mit dem bei uns isolierten Enzym verglichen. Dies geschieht disk-elektrophoretisch im System 1 nach Maurer⁷⁶⁾. Die

Tabelle 9 Anreicherung von DAP I aus Rindermilz

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamt= aktivität (E)	spez. Aktivität (E/mg)	Anreich. Faktor
saurer					
Extrakt	3730	9437	1119	0.12	-
45-70 AS	130	1448	719	0.5	4.17
Hitzefra.	113	979	345	0.35	0.7
UZ-Frakt.	26	540	256	0.47	1.34
Sepharose					
-Fraktion	13.5	87	361	4.15	8.83
CM-Frakt.	5	3.5	279	79.7	19.21

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgt in Plattengelen aus Polyacrylamid mit einem exponentiellen Konzentrationsgradienten von 5 bis 25 % Acrylamid in Anodenrichtung. Das weitmaschige Obergel besteht aus 3 % Polyacrylamid. Gelzusammensetzung und Elektrodenpuffer entsprechen den Angaben nach Laemmli⁷⁷⁾. Auch eine vergleichende Glukagonspaltung nach den Angaben von Callahan⁷⁸⁾ wird durchgeführt. Alle Ergebnisse zeigen keinen Unterschied in den Präparaten, so daß alle nachfolgend beschriebenen Peptidspaltungen nur noch mit dem käuflichen Enzym durchgeführt werden. Weitere Versuche zur Anreicherung und Charakterisierung des Enzyms werden aufgegeben zu Gunsten der Entwicklung einer Identifizierungsmethode der Spaltstücke mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie und anschließenden Massenspektrometrie.

2.2 Spaltung mit DAP I

Spaltungen an verschiedenen Peptiden und Proteinen wie Glukagon, β -Corticotropin, Sekretin, A- und B-Kette von Rinderinsulin, Angiotensin II, Gastrin und Spinat-Plastocyanin wurden schon mit dem Rattenleber-^{18), 73), 78)} oder Rindermilzenzym^{19), 79), 80)} durchgeführt. Die Verdauung findet bei 37°C und pH-Bereichen zwischen pH 5.0 - 6.0 statt. Das Enzym benötigt zur Aktivierung Cl⁻-Ionen und ein SH-Substrat. Zur Ausschaltung von Dipeptidaseaktivität enthält der Puffer noch EDTA. Die Pufferzusammensetzung entspricht der bei Seifert⁸⁵⁾ beschriebenen Zusammenstellung. Im experimentellen Teil wird die generelle Methode eines Spaltansatzes beschrieben.

DAP I hydrolysiert Polypeptide vom Aminoende zum Carboxylende oder bis zu einem Pro-, Lys- oder Arg-Rest in der Kette^{21), 81)}. Bei Anwesenheit der Letzteren können diese den enzymatischen Abbau hemmenden Aminosäuren durch einen Ein-Schritt-Edmanabbau entfernt werden und anschließend die Hydrolyse weitergeführt werden.

Wird in dem Peptid- oder Protein die N-terminale Aminosäure durch chemische Methoden entfernt und das dann entstandene Polypeptid einem enzymatischen Abbau mit DAP I unterworfen, so erhält man die zu dem Abbau ohne vorherige Entfernung der aminoendständigen Aminosäure überlappenden Dipeptide. Im günstigsten Fall kann so in drei Schritten die Aminosäuresequenz eines Peptids ermittelt werden.

Ein potentieller Nachteil ist die Forderung nach äußerst wirksamen Methoden, um die Mischung in einzelne Komponenten zu trennen und jedes Dipeptid zu identifizieren. Beim Edmanabbau arbeitet man nur mit 20 Aminosäuren und allein schon durch die Bestimmung der Rf-Werte ist eine Unterscheidung der 20 PTH-Aminosäuren

möglich. Die Identifizierung aller Dipeptide in einer Mischung, wie sie bei einer DAP-Hydrolyse entsteht, ist eine sehr schwierige Aufgabe und nahezu unmöglich. Im Folgenden soll eine Methode zur Gruppentrennung von Dipeptidmischungen mit Hilfe der HPLC und anschließender massenspektrometrischer Identifizierung gezeigt werden.

2.3 Derivatisierung der Spaltprodukte

Die für eine Trennung erforderlichen Eigenschaften wie z.B. Molekulargewicht, Ionenladung, Hydrophilie oder Konformation sind bei verschiedenen Dipeptiden oft sehr ähnlich. Eine vollständige Trennung kann nur möglich sein, wenn die Mischung eine kleine Anzahl an Dipeptiden enthält, die unterschiedliche Merkmale aufweisen. Deshalb sind Rf-Werte oder Retentionszeiten unzureichend für die Identifizierung von Dipeptiden aus einem DAP-Hydrolysat eines Polypeptids. Die Charakterisierung wird heute mit Hilfe von Ionenaustausch- und Paplerchromatographie⁸²⁾ durchgeführt. Diese Anwendung ist aber umständlich und zeitaufwendig und begrenzt die Abbaurate. Die Identifizierung durch Elutionsdauer und Rf-Werte⁷⁸⁾ ist ebenfalls aufwendig. Besondere Aufmerksamkeit hat heute die Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Es werden flüchtige Derivate hergestellt wie die N-Acetoacetyl-dipeptidmethylester²⁰⁾ und die Pertrimethylsilyldipeptide⁸³⁾. Dabei ist die Gaschromatographie sehr schnell und empfindlich, während die Massenspektrometrie leicht interpretierbare Daten liefert. Diese Methode hat aber Nachteile. Die Identifizierung von Glutaminyl- und Asparaginyldipeptiden ist nicht möglich, da die Aminosäuren Gln und Asn bei der Derivatisierung hydrolysiert werden. Man erhält Glutamyl- und Asparagyl-

Dipeptide. Serin und Threonin enthaltende Dipeptide werden dehydratisiert. Asp-X-Dipeptide bilden zyklische Imide und Glutaminsäure kann zu Pyroglutaminsäure zyklisieren.

Wir entschlossen uns die Dipeptide und DAP-Hydrolysate mit 2.4-Dinitrofluorbenzol, SANGER's Reagenz⁴⁾, zu den DNP-Dipeptidderivaten umzusetzen. Dabei wird in schwach alkalischem Medium gearbeitet und die Aminosäuren wie Gln, Asn, Thr und Ser werden nicht zerstört. Die Derivatisierung wird nach Edwards⁸⁴⁾ durchgeführt. Dabei wird statt in Alkohol in Dioxan als Lösungsmittel für DNFB gearbeitet, um die Dinitrophenyläthylätherbildung zu unterdrücken und eine größere Löslichkeit der Dipeptide zu erzielen. Überschüssiges DNFB und DNP werden mit Äther extrahiert. Nach dem Ansäuern der wässrigen Phase lassen sich die meisten DNP-Dipeptide mit Essigsäureäthylester ausschütteln.

Die DNP-Derivate besitzen mehrere Vorteile. Sie sind leicht erkennbar durch ihre intensive gelbe Farbe und durch die Absorption von Ultravioletttem Licht bei 360 und 254 nm. Sie sind relativ stabil und können in der Mehrzahl durch Extraktion mit Äther gereinigt werden. Die Trennung von DNP-Derivaten ist durch Dünnschicht- oder Papierchromatographie^{85), 86)}, DC- oder PC-Elektrophorese⁸⁷⁾, Kieselgel-Säulenchromatographie⁸⁸⁾ oder Gaschromatographie^{86), 89)} möglich. Auch die Trennung mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie^{90), 91)} wurde versucht.

3. HPLC von DNP-Dipeptiden

Die Trennung von kurzkettingen Peptiden wurde bisher vorwiegend mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie⁸⁸⁾ oder durch elektrophoretische Methoden¹⁰⁾ durchgeführt. Man verwendete Säulenchromatographie oder

Schichttechniken. Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie hat in den letzten Jahren zunehmend auch für die Trennung von Peptiden und Proteinen an Bedeutung gewonnen. Es wurde gezeigt, daß besonders die HPLC an Umkehrphasen (reversed phase chromatography) zu sehr guten Ergebnissen führen kann^{22), 92), 93)}.

Die HPLC an RP-Phasen wurde von Horvath und Mitarbeitern⁹⁴⁾ theoretisch begründet und gestattet gezielte Aussagen über die relative Retention kurzkettiger Peptide. Nach diesen Autoren wird die Retention durch einen reversiblen Assoziationsprozeß zwischen den gelösten Molekülen und den Kohlenwasserstoffketten (C_8 , C_{18}) an der Kieselgeloberfläche hervorgerufen. Wesentliche Parameter sind dabei die effektive hydrophobe Oberfläche der Moleküle in Lösung und die Oberflächenspannung des Elutionsmittels. Beim Lösen lipophiler Moleküle in wäßrigen Systemen müssen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen des Wassers gelöst werden. Die für diesen Prozeß notwendige Energie wird bei der Adsorption an die unpolare Matrix zumindestens teilweise wieder frei. Bei ionischen Molekülen mit lipophiler Seitenkette, z.B. bei den Aminosäuren, wird besonders der polare Molekülteil von einer Hydrathülle umgeben, deren Größe auch unter anderem vom Ladungszustand ($-COOH \rightleftharpoons -COO^-$) abhängt. Somit ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung zu erwarten, daß die Retention von Aminosäuren vom pH-Wert des Elutionsmittels entscheidend beeinflusst wird. Die Hydrathülle kann den hydrophoben Teil des Moleküls aus sterischen Gründen teilweise abschirmen und somit die die Retention bestimmende effektive hydrophobe Oberfläche des Moleküls verändern. Eine große Oberflächenspannung des Elutionsmittels vermindert die Retention - "Die Moleküle werden aus der Lösung herausgedrängt" ⁹⁵⁾. Durch den Zusatz von Salzen wird die Oberflächen-

Tabelle 10 k-Werte einiger DNP-Dipeptide

Y/X	Ser-	Gly-	Glu-	Thr-	Ala-	Pro-	Met-
-Ser	-	-	-	-	2.03	2.03	4.81
-Gly	-	1.32	1.03	1.97	2.52	2.68	6.36
-Glu	-	-	-	-	2.36	2.48	5.65
-Thr	-	2.16	-	-	3.42	-	-
-Ala	1.71	2.23	2.65	-	4.36	3.84	7.23
-Pro	-	3.26	-	-	4.58	-	-
-Met	-	5.13	-	-	6.81	8.10	13.00
-Val	-	5.52	5.97	-	7.45	8.65	-
-Trp	-	7.39	8.48	-	8.94	10.03	13.39
-Ile	-	7.97	-	-	11.71	10.52	-
-Phe	6.94	8.29	-	9.90	10.29	10.87	14.42
-Leu	7.58	8.03	-	-	10.38	10.81	14.48
-His	-	9.84	-	-	13.39	-	-
-Lys	-	13.36	-	-	15.07	-	-
-Tyr	-	16.94	14.94	-	17.39	19.65	20.16

Val-	Trp-	Ile-	Phe-	Leu-	His-	Lys-	Tyr-
-	-	-	7.68	7.84	8.42	-	-
6.16	7.94	8.77	9.19	9.13	9.71	13.19	17.19
-	8.81	-	-	-	-	-	20.55
-	-	-	-	-	-	-	-
7.71	9.68	10.03	10.77	10.74	12.23	-	20.42
9.13	-	-	12.16	12.87	13.39	-	-
-	-	-	-	16.87	-	-	-
13.71	-	14.29	14.68	15.13	-	18.61	23.97
13.52	14.59	-	17.10	17.39	-	-	-
-	-	16.81	-	-	-	-	-
15.00	16.26	-	20.00	17.97	-	20.61	25.45
15.32	16.29	-	17.77	20.42	-	20.81	25.77
-	-	22.35	-	-	-	-	-
18.94	-	-	-	-	-	-	-
20.65	-	-	23.19	25.32	25.58	24.61	29.45

spannung gesteigert und damit die Retention vermindert.

In der RP-HPLC ist also die Retention um so geringer, je geringer die effektive hydrophobe Oberfläche und um so höher die Oberflächenspannung des Elutionsmittels ist⁹⁶⁾.

Die Aminosäuren sind nach drei verschiedenen Methoden nach ihrer Hydrophobizität geordnet worden^{97), 98), 99)}.

In der durch diese Ermittlungen bestimmten Reihenfolge werden die Aminosäuren bei RP-Chromatographien eluiert - es gibt jedoch noch kein Lösungsmittelsystem, in dem alle Aminosäuren optimal getrennt werden können.

Es gilt folgende Reihenfolge für die Elution:

Gln, Asn, Ser, Thr, His, Glu, Asp, Gly, Lys, Ala, Arg, Cys, Pro, Met, CysSS, Val, Tyr, Ile, Leu, Phe, Trp²²⁾.

Zum Studium der HPLC-Trennung und -Charakterisierung von DNP-Dipeptiden wurde eine große Zahl von Dipeptiden mit Dinitrofluorbenzol nach Sänger umgesetzt und durch HPLC gereinigt. Die Präparate sind nach HPLC und HPTLC einheitlich, die Struktur ist durch das Massenspektrum gesichert.

Die an einer analytischen HPLC-Säule (RP-8) im System Acetonitril-Essigsäure pH 2.5 ermittelten Kapazitätsfaktoren sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Die Chromatogramme zweier Mischungen von DNP-Dipeptiden zeigen die Abbildungen 10 und 11. Aus dem Vergleich der Abbildungen mit den k -Werten erkennt man, daß Peptide mit einem Unterschied von $k \sim 0.2$ vollkommen getrennt werden können.

Bei den aus unpolaren Aminosäuren aufgebauten Dipeptiden beobachtet man unabhängig von der Stellung der Aminosäure am Amino- oder Carboxylende des Dipeptids die folgende Reihe zunehmender k -Werte:

Gly, Ala, Pro, Met, Val, Trp, Ile, Phe, Leu, Lys, Tyr.
Die Ordnung der Aminosäuren stimmt gut mit derjenigen

Abb. 10 HPL-Chromatogramm eines DNP-Dipeptidgemisches (Erläuterungen siehe Text)

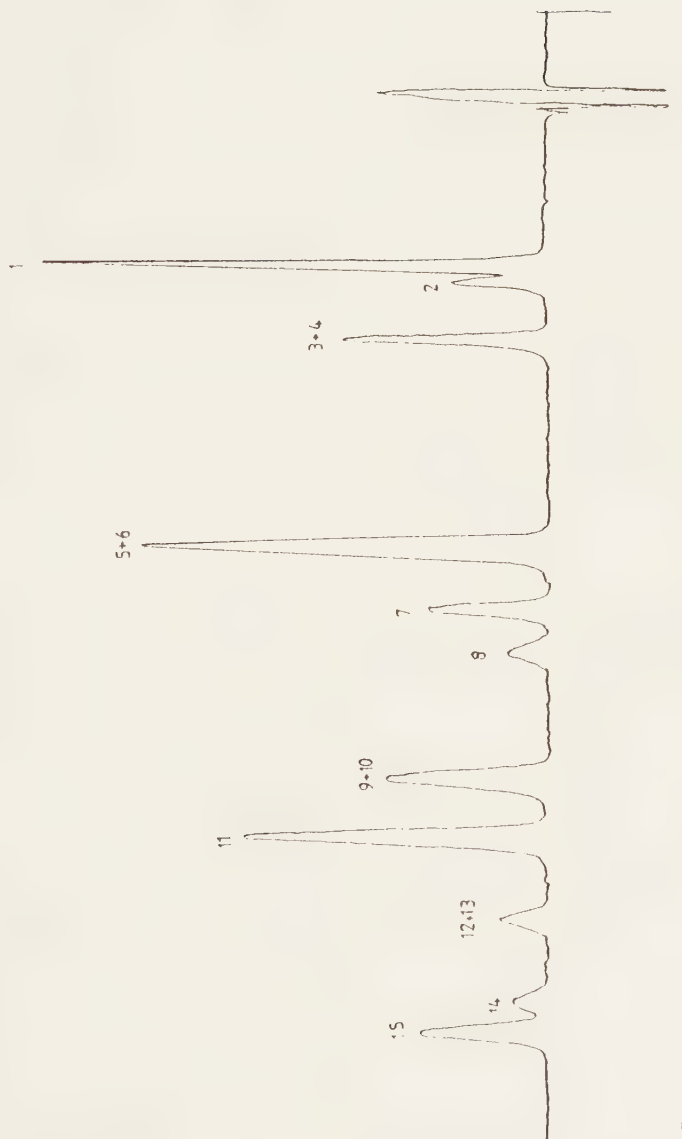
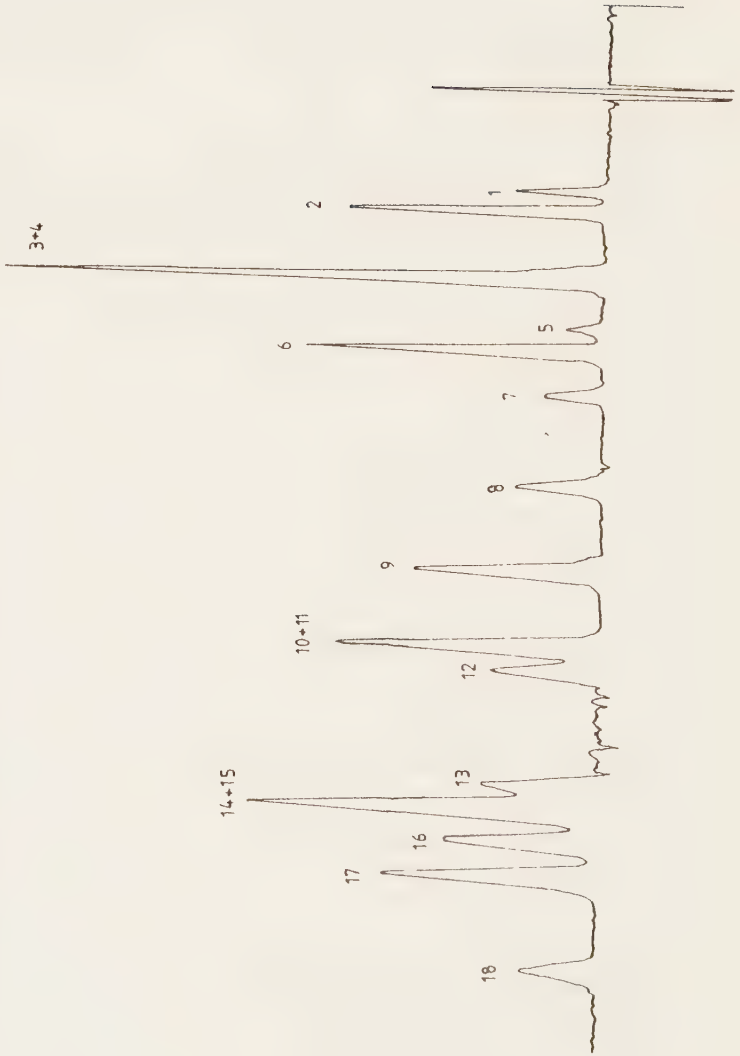


Abb. 11 HPL-Chromatogramm eines DNP-Dipeptidgemisches (Erläuterungen siehe Text)



Legende zu Abb. 10: Säule 7 μm Lichrosorb RP 8; Fließmittel, Acetonitril-Essigsäure pH 2.5; Fluß, 2.0 ml/min Gradient, 20% bis 60% Acetonitril in 60 min.; Temperatur, 60°C; Detektor, UV III 360 nm; Probe, 5 μl ca. 0.3 μg jeder Komponente enthaltend; DNP-Dipeptide 1 = Gly-Thr, 2 = Pro-Hypro, 3 + 4 = Ala-Gly + Glu-Ala, 5 + 6 = Ala-Pro + Met-Ser, 7 = Gly-Val, 8 = Glu-Val, 9 + 10 = Ser-Leu + Gly-Trp, 11 = Pro-Met, 12 + 13 = Ala-nVal + Ile-Gly, 14 = Gly-His, 15 = Pro-Trp.

Legende zu Abb. 11: Bedingungen wie oben enthaltene DNP-Dipeptide: 1 = Glu-Gly, 2 = Gly-Asp, 3 + 4 = Ser-Ala + Thr-Gly, 5 = Ala-Glu, 6 = Pro-Gly, 7 = Gly-Pro, 8 = Met-Asn, 9 = Gly-Met, 10 + 11 = Gly-nVal + Met-Gly, 13 = Met-Ala, 14 + 15 = Ala-Val + Val-Ala, 16 = Gly-Ile, 17 = Gly-Phe, 18 = Phe-Gly.

der hydrophoben Aminosäuren

Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp überein. Die Einordnung der Aminosäuren Serin, Glutaminsäure und Threonin ist wegen der geringen Anzahl der zur Zeit vorhandenen Dipeptide vorläufig. Die Unterschiede in der Retention sind primär auf die Einführung der, verglichen mit der NH_2 -Gruppe, unpolaren Dinitrophenylaminogruppe zurückzuführen. Die hohen Kapazitätsfaktoren der Tyrosin enthaltenden Dipeptide sind verständlich, da unter unseren Derivatisierungsbedingungen die Aminogruppe und die phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosins zum N,O-Di-DNP-Dipeptid umgesetzt werden. Interessant ist die vergleichende Betrachtung der Retentionszeiten isomerer DNP-Dipeptide (DNP-X-Y-OH/DNP-Y-X-OH). In Tabelle 10 stehen die DNP-Dipeptide, die aus einer Aminosäure aufgebaut sind, auf einer Diagonalen vom DNP-Ser-Ser-OH bis zum N,O-Di-DNP-Tyr-Tyr(ODNP)OH. Bei den Peptiden oberhalb der Dia=

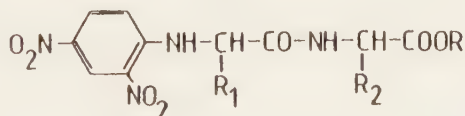
gonalen ist die Aminosäure X hydrophober als die Aminosäure Y. Der k-Wert des DNP-X-Y-OH ist größer als der k-Wert des isomeren DNP-Y-X-OH. Dies ist verständlich, wenn man annimmt, daß der hydrophobe DNP-Rest und die größere Seitenkette der hydrophoben Aminosäure eine gemeinsame effektive hydrophobe Oberfläche ausbilden können, was zu verstärkter Retention führt. Umgekehrt ist nach dieser Vorstellung zu erwarten, daß eine kürzere Retention beobachtet wird, wenn eine polarere Aminosäure zwischen den DNP-Rest und die unpolare Aminosäure eingefügt ist. Tatsächlich ist bei den DNP-Peptiden DNP-X-Y-OH unterhalb der Diagonalen die Aminosäure X hydrophiler als die Aminosäure Y, dementsprechend der k-Wert für DNP-X-Y < DNP-Y-X. Die in Tabelle 10 aufgenommenen Dipeptide mit den polaren Aminosäuren Serin, Glutaminsäure und Threonin deuten an, daß sich auch polare Aminosäuren in das Netz einordnen lassen. Die Daten der Tabelle 10 müssen noch weiter vervollständigt werden und verstärkt auf hydrophile Dipeptide bzw. Dipeptide mit einer hydrophilen und einer hydrophoben Aminosäure ausgedehnt werden. Die Tabelle erlaubt schon jetzt aus der Retentionszeit (Kapazitätsfaktor) eines unbekannten Dipeptids die Zahl der möglichen Dipeptide einzugrenzen. Die endgültige Struktur gibt das Massenspektrum.

4. Die Diskussion der massenspektrometrischen Fragmentierungen der DNP-Dipeptide und DNP-Dipeptidmethylester

Die Massenspektrometrie wurde bisher mehrfach zur Sequenzanalyse von Peptiden eingesetzt¹⁰⁰⁾. Peptide mit maximal zehn Aminosäuren wurden nach Derivatisierung am Amino- und Carboxylende des Peptids durch Direktverdampfung untersucht¹⁰¹⁾. In Sonderfällen konnte

auch die Sequenz längerer Peptide geklärt werden¹⁰²⁾. Größere Peptide wurden nach enzymatischer¹⁰³⁾ oder chemischer Hydrolyse im Gemisch zu Polyaminoalkoholen reduziert und diese nach Derivatisierung (Trimethylsilylierung, Perfluoralkylierung) über die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie getrennt und in ihrer Struktur geklärt^{104), 105), 106)}.

Unser Bestreben war es, die bei der enzymatischen Hydrolyse entstehenden Peptidgemische in einem für die HPLC-Detektion geeigneten Verfahren zu derivatisieren, zu trennen und anschließend die reinen Fraktionen oder Gemische aus wenigen DNP-Dipeptiden der MS-Analyse zu unterwerfen. Deshalb wurden die Massenspektren der gereinigten DNP-Dipeptide 28 und DNP-Dipeptidmethylester 29 aufgenommen und hinsichtlich ihrer Eignung für die Sequenzanalyse untersucht.



R = H 28

= CH₃ 29

R₁ und R₂ = Aminosäureseitenkette

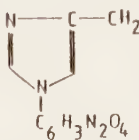
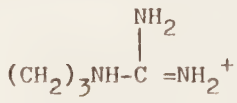
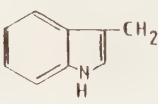
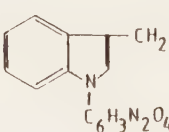
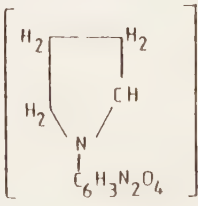
Die massenspektrometrische Sequenzanalyse von Peptiden beruht auf der Bildung charakteristischer Sequenzionen, die durch den formalen Bruch links und rechts der Amidcarbonylgruppe gebildet werden¹⁰⁷⁾.

Daneben beobachtet man Sonderfragmentierungen, die die Anwesenheit einer Aminosäure im Peptid anzeigen, aber keine Auskunft über die Stellung geben¹⁰⁸⁾. Ionen aus diesen Fragmentierungen und solche aus Gerüstumlagerungen und Wasserstoffwanderungen können die Massenspektren sehr komplex werden lassen¹⁰⁹⁾.

Tabelle 11 Sequenzionen der dinitrophenylierten
N-terminalen Aminosäure aus DNP-Dipeptiden

Aminosäure	R_1	R_1 m/e	S_1 30 m/e
Gly	H	1	196
Ala	CH_3	15	210
Ser	CH_2OH	31	226
	$\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_4$	197	392
Val	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	43	238
nVal	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	43	238
Thr	$\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2$	45	240
Cys	CH_2SH	47	242
	$\text{CH}_2\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_4$	213	408
Leu	$\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	57	252
nLeu	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	57	252
	CH_3		
Ile	$\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	57	252
Asn	$\text{CH}_2-\text{CONH}_2$	58	253
Asp	CH_2-COOH	59	254
Gln	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$	72	267
Glu	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	73	268
Lys	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	73	268
	$\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_4$	238	433
Met	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	75	270
His	$ \begin{array}{c} \text{N} \text{-----} \text{C} - \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N}^+ \\ \text{H}_2 \end{array} $	81	276

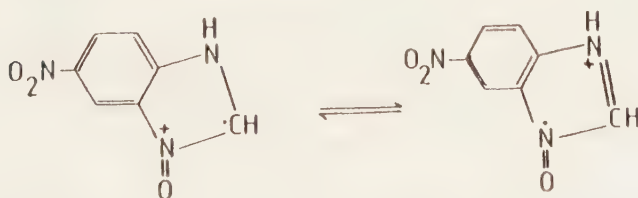
Fortsetzung Tabelle 11

Aminosäure	R ₁	R ₁ m/e	S ₁ 30 m/e
His		247	442
Phe	CH ₂ -C ₆ H ₅	91	286
Arg		101	296
Tyr	CH ₂ -C ₆ H ₅ -OH	107	302
	CH ₂ -C ₆ H ₅ -O-C ₆ H ₃ N ₂ O ₄	273	468
Trp		130	325
		296	491
Pro			236
	≅ S ₁		

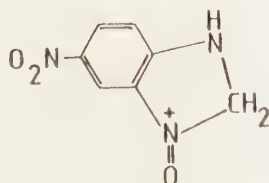
Leu/Ile/nLeu oder Val/nVal nicht möglich ist. Hier hilft die Retentionszeit bei der HPLC.

Die anderen intensiven Ionen der Massenspektren sind als nicht sequenzcharakteristische Fragmentierungen ausgehend vom Molekülion oder vom Sequenzion zu verstehen. Die Molekülionen der DNP-Dipeptide verlieren Wasser ($M^+ - 18$), Hydroxyl ($M^+ - 17$), NO ($M^+ - 30$) und NO₂ ($M^+ - 46$). Bei den DNP-Dipeptidestern beobachtet man zusätzlich den Verlust von COOCH₃ ($M^+ - 59$) und OCH₃ ($M^+ - 31$).

Als Folgefragmentierungen aus S₁ ist bei den Aminosäuren Met, Ile, Leu, nLeu und Val die Eliminierung der Seitenkette R₁ zu beobachten. Das führt zu dem Bruchstück m/e 196, das mit dem Sequenzion von DNP-Gly-X isomer ist. Eine Verwechslung ist aber nicht möglich, da die Sequenzionen 100 % relative Intensität aufweisen. Weiterhin werden aus allen Sequenzionen S₁ NO (S₁ - 30), NO₂ (S₁ - 46) und OH (S₁ - 17) eliminiert. Für die Bruchstücke mit den Massen m/e 179 und m/e 180 können möglicherweise die folgenden Strukturen 31 und 32 formuliert werden.



31 m/e 179



32 m/e 180

Tabelle 12 Fragmentationen von DNP-Dipeptiden und DNP-Dipeptidestern

DNP-Dipeptid	S ₁ 30	M ⁺	Folgefragmente von S ₁	Folgefragmente von M ⁺
Gly-Gly	196	298		268, 252
Gly-Ala	196	312	180, 179, 166, 150	296, 294, 282, 266
Gly-Pro	196	338	180, 179, 166, 150	322, 320, 308, 292
Gly-Val	196	340	180, 179, 166, 150	324, 323, 310, 294, 240
Gly-nVal	196	340	180, 179, 166, 150	324, 322, 310, 298, 294
Gly-Thr	196	342	166, 150	324, 307, 278
Gly-Leu	196	354	180, 179, 166, 150	339, 324, 308, 298, 280
Gly-nLeu	196	354	180, 179	338, 337, 336, 324, 308, 298
Gly-Ile	196	354	166, 150	338, 337, 336, 324, 309, 306, 298, 280
Gly-Met	196	372	180	354, 342, 338, 311
Gly-Phe	196	388	180, 179	370, 358, 353, 342, 240, 148
Gly-Trp	196	427		409, 397, 393, 381, 187
Gly-Tyr	196	570		553, 552, 535, 524, 516, 403, 330, 273, 167, 163
ODNP				
Gly-LeuOCH ₃	196	368	180, 179, 166, 150	353, 352, 338, 337, 322, 312, 309, 294
Gly-MetOCH ₃	196	386	180, 166, 150	356, 351, 327, 325

Fortsetzung Tabelle 12

DNP-Dipeptid	S ₁ 30	M ⁺	Folgefragmente von S ₁	Folgefragmente von M ⁺
Gly-PheOCH ₃	196	402		372, 367, 356, 240, 162, 131
Gly-TyrOCH ₃ ODNP	196	584	179	567, 550, 549, 344, 273, 179 177
β-Ala-Gly	196	312		294, 282
Ser-Tyr	226	434	208, 193	416, 404, 398, 164, 107
Ala-Gly	210	312	193, 180, 164	294, 282
Ala-Ala	210	326		296
Ala-Pro	210	352	194, 193, 180, 164	322
Ala-Val	210	354	194, 193, 180, 164	338, 336, 309, 308
Ala-nVal	210	354		324
Ala-Thr	210	356		338, 292
Ala-Ile	210	368		352, 338, 322
Ala-Leu	210	368	194, 193, 180, 165, 164, 134, 118	353, 338, 322
Ala-Met	210	386	194, 180, 164, 134	368, 356, 351, 325
Ala-Trp	210	441		187, 130
Ala-Tyr ODNP	210	584	197	566, 549, 538, 330, 302, 273 167
Ala-ProOCH ₃	210	366	194, 193, 180, 164	335, 307

Fortsetzung Tabelle 12

DNP-Dipeptid	S ₁ 30	M ⁺	Folgefragmente von S ₁	Folgefragmente von M ⁺
Ala-LeuOCH ₃	210	382	194, 193, 164	367, 351, 336, 326, 323
Ala-TyrOCH ₃	210	(598)	194, 193	583, 344, 273, 177
ODNP				
Val-Gly	238	340	222, 221, 192	324, 310
Val-Ala	238	354	222, 221, 208	338, 336, 324
Val-Pro	238	380	222, 221, 208, 192	350, 337, 291
Val-Val	238	382	222, 221, 208, 192	
Val-Leu	238	396	222, 221, 208	381, 366
Val-Phe	238	430	221, 208, 192	412, 400, 384, 341, 313
Val-Tyr	238	(612)	222, 221, 192	594, 566, 523, 330, 302, 273
ODNP				167
Val-ProOCH ₃	238	394	kein 238 - 43, 222, 221, 208, 196	379, 378, 364, 363, 351, 335
Val-PheOCH ₃	238	444	kein 238 - 43, 208	414, 398, 385
Val-TyrOCH ₃	238	626	222, 221, 192	609, 595, 583, 580, 565, 344, 273, 177
ODNP				
Thr-Phe	240	(432)		388, 341, 91
Leu-Gly	252	354	222, 206, 196	339, 324, 297
Leu-Ala	252	368	236, 222, 196	353, 338, 323

Fortsetzung Tabelle 12

DNP-Dipeptid	S ₁ 30	M ⁺	Folgefragmente von S ₁	Folgefragmente von M ⁺
Leu-Pro	252	394	236, 222, 196	
Leu-Val	252	396	236, 222, 206, 196	381, 366, 350
Leu-Leu	252	410	196	395, 380, 365
Leu-Met	252	428	236, 222, 196, 180, 179	398
Leu-Phe	252	444	236, 235, 222, 196	429, 414, 398
Leu-Trp	252	483	196	468, 465, 437, 187, 130
Leu-Tyr	252	(626)	236, 235, 206, 196	608, 580, 330, 273, 167
ODNP				
Leu-GlyOCH ₃	252	368	222, 206, 196	353, 352, 338, 337, 322, 309
Leu-PheOCH ₃	252	458	222, 206, 196	443, 428, 427, 412, 399
Leu-TyrOCH ₃	252	640	236, 235, 196	625, 623, 609, 594, 581, 344, 273, 177
ODNP				
Ile-His	252	434		
Glu-Val	268	412	250, 222	394, 367, 349
Met-Gly	270	372	222, 206	355, 342, 325
Met-Ala	270	386	222, 206	369, 356, 353, 339
Met-Val	270	414	254, 252, 240, 222, 206, 192	397, 384, 367, 349, 321
			192	
Met-Leu	270	428	240, 222, 206, 192	411, 398, 381, 367

Fortsetzung Tabelle 12

DNP-Dipeptid	S ₁ 30	M ⁺	Folgefragmente von S ₁	Folgefragmente von M ⁺
Met-Met	270	446		416, 61
Met-Tyr ODNP	270	(644)	222, 209	628, 627, 598, 371, 330, 302, 273, 167
Met-TyrOCH ₃ ODNP	270	658	222, 206	641, 627, 344, 302, 273, 177
Phe-Gly	286	388	251, 240, 205, 194	297
Phe-Ala	286	402	265, 240, 237, 194, 164	384, 372, 356, 311
Phe-Pro	286	428	240, 194	398, 337, 307, 291
Phe-Val	286	430	256, 240	400, 339, 321, 309, 293
Phe-Leu	286	444	240, 194	429, 414, 393, 387, 341, 335, 323, 307, 91
Phe-Trp	286	517	267	499, 487, 471, 187, 130, 91
Phe-GlyOCH ₃	286	402	256, 251, 194, 164	372, 371, 343, 311, 279, 220
Phe-ValOCH ₃	286	444	256, 240, 194, 164	414, 413, 398, 385, 353, 323, 321, 293
Phe-LeuOCH ₃	286	458	256, 240, 194, 164	443, 428, 427, 412, 399, 367, 337, 335
Phe-TyrOCH ₃ ODNP	286	674	240, 194, 164	644, 615, 583, 565, 553, 551, 523, 495, 401, 344, 314, 273

Fortsetzung Tabelle 12

DNP-Dipeptid	S ₁ 30	M ⁺	Folgefragmente von S ₁	Folgefragmente von M ⁺
Trp-Ala		441	130	423, 411, 130
Trp-Leu	325	483	130	468, 465, 437
Trp-Phe	325	517	130	499, 487, 130, 91
Tyr-Gly ODNP	468	(570)	422, 387, 300, 273	403, 297, 273, 251
Tyr-Ala ODNP	468	(584)	422, 300, 273	417, 401, 371, 311, 265, 167
Tyr-Val ODNP	468	(612)	422, 300, 273	339, 293, 273, 265
Tyr-Leu ODNP	468	626	422, 387, 300, 273	611, 353, 307, 279, 273
Tyr-Phe ODNP	468	(660)	300, 273	387, 341, 313, 273
Tyr-GlyOCH ₃ ODNP	468	584	438, 300, 272	
Tyr-AlaOCH ₃ ODNP	468	598	452, 422	582, 581, 567, 539, 325, 273, 265
Tyr-ValOCH ₃ ODNP	468	626	422, 300	611, 595, 567, 353, 321, 293, 273, 265

Fortsetzung Tabelle 12

DNP-Dipeptid	S ₁₃₀	M ⁺	Folgefragmente von S ₁	Folgefragmente von M ⁺
Tyr-LeuOCH ₃ ODNP	468	640	452, 422	625, 609, 581, 367, 307, 279, 273
Tyr-PheOCH ₃ ODNP	468	674	422, 300	659, 643, 507, 491, 401, 369, 341, 313, 273
Pro-Gly	236	338	220, 206, 190, 144	320, 308
Pro-Ala	236	352	220, 206, 190, 144	334, 322
Pro-Val	236	380	206, 190, 144	362, 350, 334, 316
Pro-Leu	236	394	220, 206, 190, 144	379, 376, 364
Pro-Ile	236	394	220, 206, 190, 189	376, 364, 349, 348, 330
Pro-Met	236	412	220, 190, 172, 144	395, 394, 377, 366, 347, 319
Pro-Phe	236	428	206, 190, 144	411, 410, 398, 382, 364
Pro-Tyr	236	444		327, 107
Pro-MetOCH ₃	236	426	220, 190	409, 391, 380, 367, 361
Pro-PheOCH ₃	236	442	220, 190	424, 411, 396, 383

Diese Fragmente werden auch im Massenspektrum des dinitrophenylierten Methylamin, dem N-Methyl-2.4-dinitroanilin, gefunden, dagegen sind sie kaum im N-Phenyl-2.4-dinitroanilin zu beobachten. Der Verlust von NO führt zu den Bruchstücken der Massen m/e 149 und m/e 150. Weitere Eliminierung von NO_2 ergibt Fragmente mit m/e 103 und m/e 104. Dies wird auch in Abbildung 19, dem Massenspektrum von DNP-Gly-Leu aus einem enzymatischen Abbau deutlich.

4.1 Sonderfragmentierungen

Einzelne Aminosäuren zeigen charakteristische Fragmentierungen, die eine zusätzliche Sicherung für die Identifizierung der Aminosäuren der DNP-Dipeptide bieten können, in der Regel aber nur die Anwesenheit einer Aminosäure im Peptid anzeigen, aber nicht zwingend für die Stellung im Peptid sind. In den folgenden Abschnitten werden einige bis jetzt beobachtete Beispiele besprochen.

4.1.1 Methionin

Die Methionin enthaltenden Dipeptide zeigen das Bruchstück der Masse m/e 61 ($\text{CH}_3\text{-S-CH}_2$). Steht diese Aminosäure C-terminal im dinitrophenylierten Dipeptid, so findet man $\text{M}^+ - 61$ als charakteristisches Fragment. Als Beispiele kann man in Tabelle 12 DNP-Gly-Met ($\text{M}^+ 372 \rightarrow m/e 311$), DNP-Gly-MetOCH₃ ($\text{M}^+ 386 \rightarrow m/e 325$), DNP-Pro-Met ($\text{M}^+ 412 \rightarrow m/e 351$) und andere ansehen (Abb. 12).

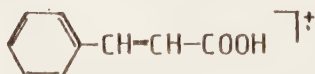
Steht diese Aminosäure N-terminal, so verliert das Sequenzion S_1 Methanthiol ($\text{CH}_3\text{SH } m/e 48$). In allen DNP-Met-X Dipeptidkombinationen ist die Fragmentation $\text{S}_1 \rightarrow m/e 222$ zu finden.

4.1.2 Threonin und Serin

Während Serin enthaltende DNP-Dipeptide noch einen Molekülpeak zeigen (0.5 % relative Intensität), ist bei Threonin enthaltenden DNP-Dipeptiden das Molekülion M^+ kaum zu finden. Beide Aminosäuren werden thermisch in der Ionenquelle dehydratisiert. Sie zeigen in ihren Spektren Signale bei $M^+ - 18$. Als Beispiel ist DNP-Ala-Thr hervorzuheben (Abb. 13).

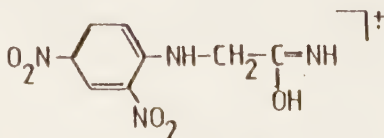
4.1.3 Phenylalanin

In C-terminaler Stellung zeigt diese Aminosäure McLafferty-Umlagerung. Dabei entsteht als Bruchstück das Zimtsäureradikalkation 33 mit der Masse m/e 148.



33 m/e 148

Im DNP-Gly-Phe (M^+ 388, Abb. 14) führt diese Eliminierung zu dem Fragment m/e 240, das eine relative Intensität von 40 % (S_1 100 %) hat. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß auch die DNP-Dipeptide Gly-Leu, Gly-Ile und Gly-Val ein Signal mit der Masse m/e 240 aufzeigen. Dieses ist ebenfalls auf eine McLafferty-Umlagerung zurückzuführen. Das sich ergebende Fragment hat die Struktur 34.



34 m/e 240

Noch ausgeprägter zeigen die DNP-X-Phenethylester diese Fragmentierung. Nur bei DNP-Pro-PheOCH₃ ist diese Eli=

Tabelle 13 Charakteristische Fragmentierung bei
DNP-Phe-X Dipeptiden

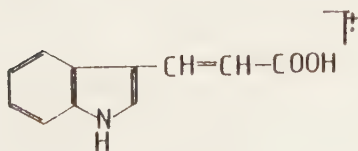
DNP-Dipeptid	M ⁺ (% rel. Int.)	M ⁺ -91(% rel. Int.)
Phe-Gly	388 (10)	297 (34)
Phe-Ala	402 (5)	311 (19)
Phe-Pro	428 (2)	337 (41)
Phe-Val	430 (2.5)	339 (15)
Phe-Leu	444 (2.5)	353 (12)
Phe-Phe	478 (0.4)	387 (7.6)
Phe-GlyOCH ₃	402 (3.5)	311 (26)
Phe-ValOCH ₃	444 (6)	353 (33)
Phe-LeuOCH ₃	458 (4)	367 (43)
Phe-TyrOCH ₃ ODNP	674 (1)	583 (9)

minierung nicht zu finden.

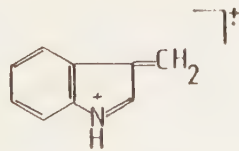
Steht Phenylalanin N-terminal, so ist die Fragmentierung M⁺ - 91 charakteristisch. Dies zeigt Tabelle 13.

4.1.4 Tryptophan

Die Massenspektren Tryptophan enthaltender DNP-Dipeptide sind immer durch besonders intensive Fragmente bei m/e 130 und m/e 187 charakterisiert. Dies wirkt sich auf die relativen Intensitäten aus. Die Sequenzionen erreichen 100 % nicht. Den beiden Bruchstücken können die angegebenen Strukturen 35 und 36 zugeschrieben werden. Dabei entsteht ähnlich wie beim Phenylalanin durch eine McLafferty-Umlagerung das Acrylsäure=



35 m/e187



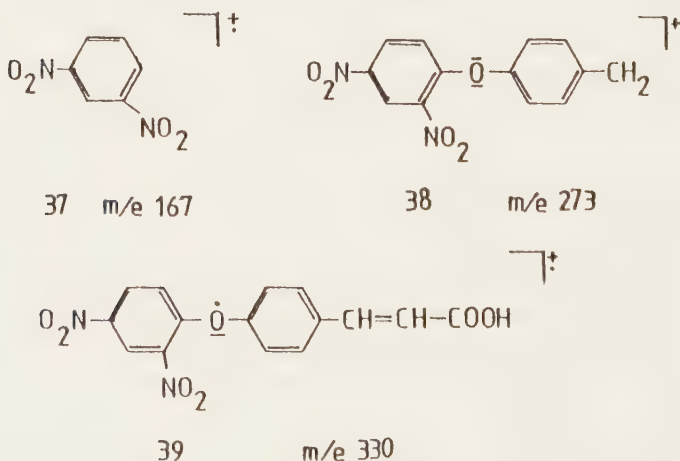
36 m/e130

derivat 35. Das Fragment 36 entspricht dem Indolyl-Derivat. Abbildung 15 zeigt ein Beispiel für DNP-Trp-X Dipeptide.

4.1.5 Tyrosin

Wie schon aus den Retentionszeiten bei der HPLC zu erkennen ist, wird bei der Derivatisierung mit Dinitrofluorbenzol auch die phenolische Hydroxylgruppe dinitrophenyliert. Dies hat auch Auswirkungen auf die massenspektrometrische Fragmentierung.

Steht Tyrosin C-terminal, so finden sich in den Spektren die Bruchstücke der Massen m/e 167, m/e 273 und m/e 330. Ihnen kommen die folgenden Strukturen 37, 38 und 39 zu.



Charakteristisch sind bei den DNP-X-Tyr(ODNP) Dipeptide die Peaks bei M^+ - 167 (z.B. DNP-Gly-Tyr(ODNP) M^+ 570 $\rightarrow m/e$ 403).

Wird die Carboxylgruppe noch zusätzlich methyliert, so geht m/e 330 in m/e 344 über. Außerdem wird ein neues Fragment bei m/e 177 und der Struktur 40 gebildet. Bei

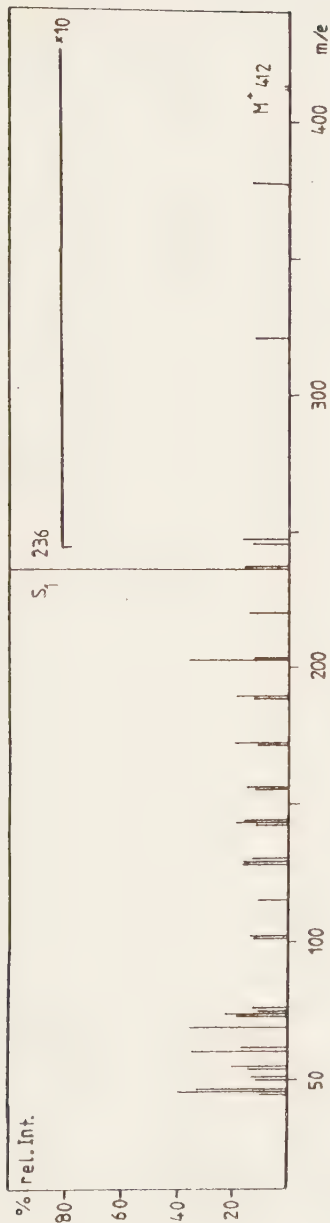


Abb. 12 Massenspektrum von DNP-Pro-Met

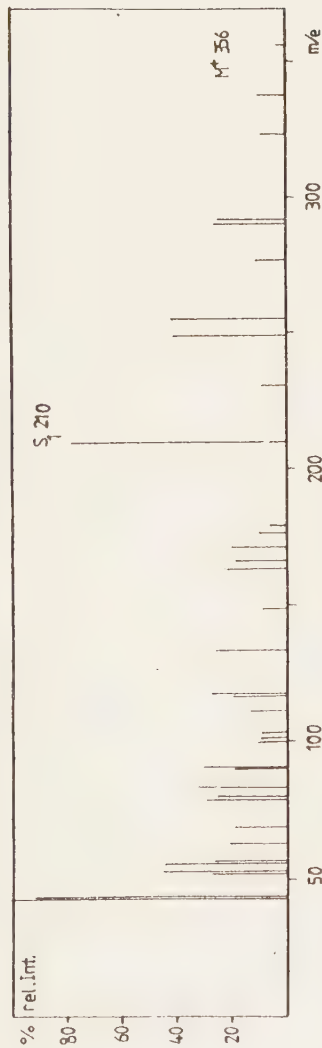


Abb. 13 Massenspektrum von DNP-Ala-Thr

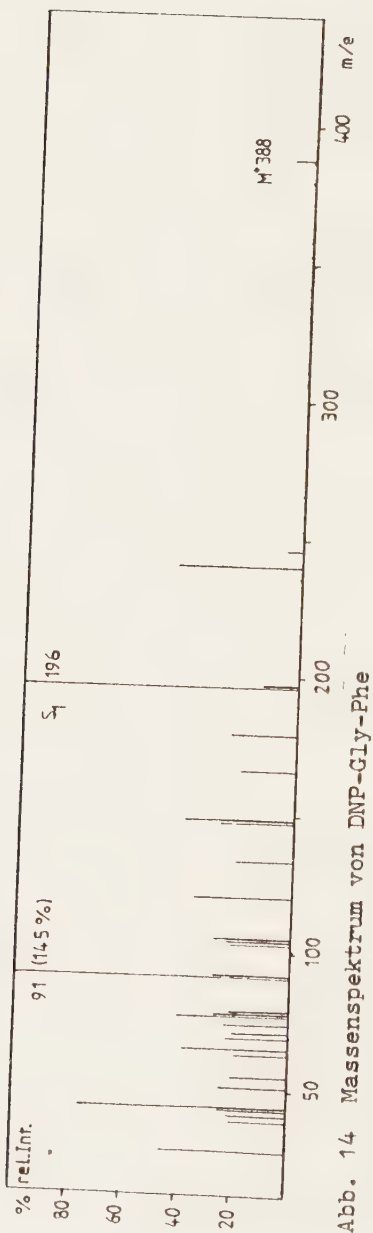


Abb. 14 Massenspektrum von DNP-Gly-Phe

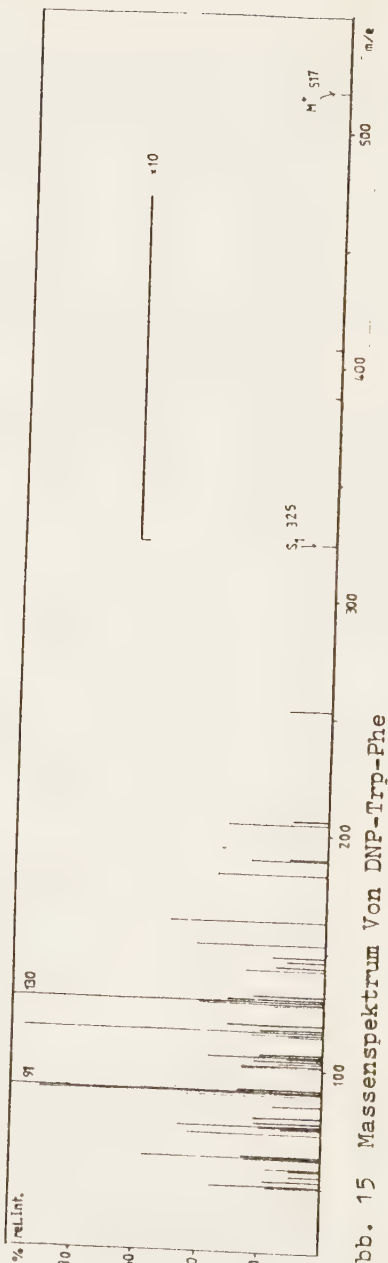


Abb. 15 Massenspektrum von DNP-Trp-Phe

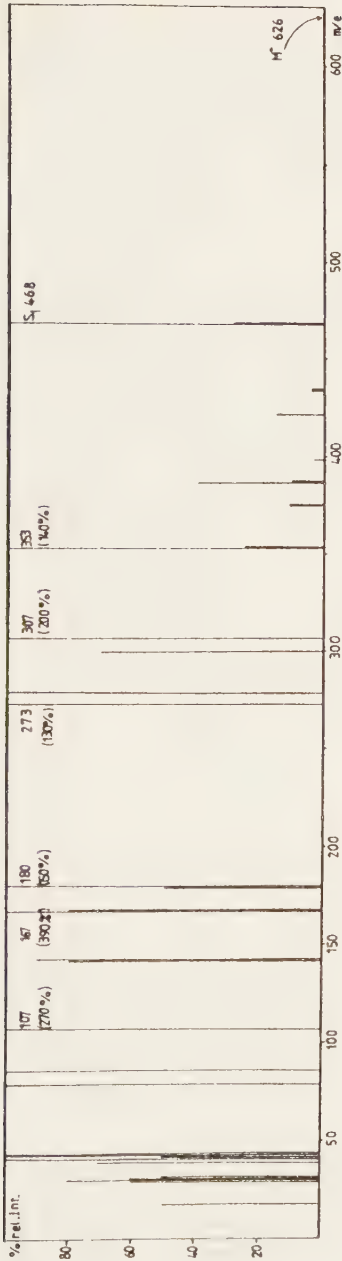


Abb. 16 Massenspektrum von DNP-Tyr(ODNP)-Leu

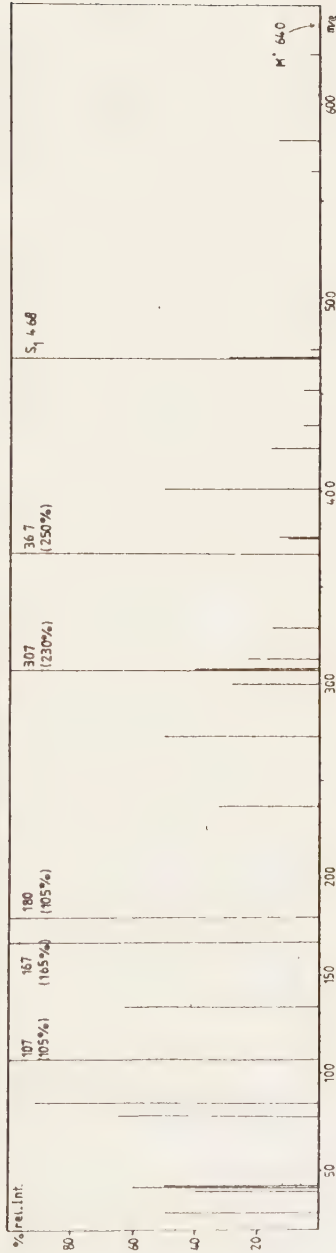
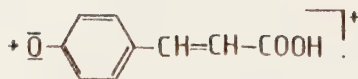


Abb. 17 Massenspektrum von DNP-Tyr(ODNP)-LeuOCH₃

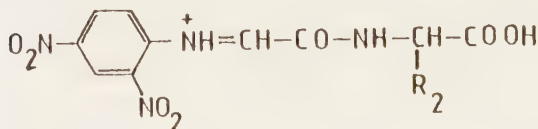


40 m/e 177

der Betrachtung der Intensitätsverteilung muß auf diese charakteristischen Fragmente besonders geachtet werden.

Erscheint Tyrosin N-terminal in den DNP-Dipeptiden, so ergeben sich folgende Sonderfragmentierungen. Aus dem Sequenzion S_1 (468) wird immer m/e 168 eliminiert, was zu dem Fragment m/e 300 führt, das alle DNP-Tyr (ODNP)-X Dipeptide zeigen (Abb. 16).

Für das Molekülion M^+ ergibt sich der Verlust von m/e 167. Besonders markant ist die Fragmentierung $M^+ - 273$, was zu Bruchstücken der Struktur 41 führt.



41

R_2 = C-terminale Aminosäureseitenkette

Als Folgefragmentierung ist der Verlust von NO_2 (m/e 46) zu betrachten. In Tabelle 14 werden die sich daraus ergebenden charakteristischen Peaks an verschiedenen Dipeptiden beschrieben.

Besondere Aufmerksamkeit verdient, daß die mit * gekennzeichneten DNP-Dipeptide kein Molekülion M^+ aufweisen.

Werden die oben diskutierten Dipeptide methyliert, so tritt auch hier die Fragmentierung $M^+ - 273$ auf, jedoch wird jetzt als Folgefragmentierung m/e 60 gefunden

Tabelle 14 Fragmentierung von M^+ an DNP-Tyr(ODNP)-X
Dipeptiden

DNP-Dipeptid	M^+ - 273	- NO ₂
Tyr(ODNP)-Gly	297	251
Tyr(ODNP)-Ala*	311	265
Tyr(ODNP)-Val*	339	293
Tyr(ODNP)-Leu	353	307
Tyr(ODNP)-Phe*	487	441

Tabelle 15 Fragmentierung von M^+ an
DNP-Tyr(ODNP)-XOCH₃ Dipeptidestern

DNP-Dipeptid	M^+ - 273	- 60
Tyr(ODNP)-GlyOCH ₃	311	-
Tyr(ODNP)-AlaOCH ₃	325	265
Tyr(ODNP)-ValOCH ₃	353	293
Tyr(ODNP)-LeuOCH ₃	367	307
Tyr(ODNP)-PheOCH ₃	401	341

(Abb. 17). Tabelle 15 zeigt die nun charakteristischen Bruchstücke.

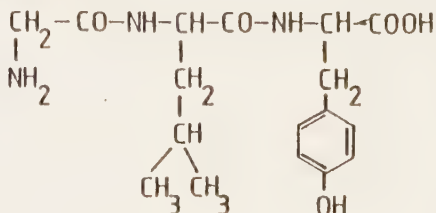
Mit den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen kann die N-terminale Aminosäure in DNP-Dipeptiden und DNP-Dipeptidmethylestern eindeutig identifiziert werden, sofern nicht strukturisomere Aminosäuren vorliegen. Eine Aussage über die Struktur und Art der C-terminalen Aminosäure kann in vielen Fällen in Verbindung mit den Retentionszeiten während der HPLC gemacht werden. Da aber in den meisten Beispielen die Intensität des Molekülionenpeaks sehr gering ist, sollte hier die Massenspektrometrie durch chemische Ionisation angewendet werden. Bei dieser Methode, die schon auf permethylierte Acetylpeptide^{110), 111), 112)} und trimethylsilylierte Dipeptide¹¹³⁾ angewendet wurde, ist es

möglich, neben dem Sequenzion auch das Molekülion mit größerer relativer Intensität zu sehen. Dadurch könnte die Sequenzaussage der Aminosäuren in dinitrophenylierten Dipeptiden noch sicherer gemacht werden.

5. Spaltungsbeispiele

Zur Demonstration der Leistungsfähigkeit der hier entwickelten Methode werden einige Peptide, deren Aminosäuresequenz bekannt ist, mit DAP I hydrolysiert, die entstandenen Mischungen derivatisiert, mit Hilfe der HPLC getrennt und mittels der Massenspektrometrie identifiziert.

5.1 Gly-Leu-Tyr



42

2.36 μmol dieses Tripeptids werden einer Hydrolyse mit DAP I unterworfen und das Hydrolysat mit DNFB derivatisiert. Schon in der Flachkammer-Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Chloroform/Tetrahydrofuran/Eisessig 10:4:0.3) sind die DNP-Derivate zu erkennen. Im HPL-Chromatogramm, das in Abbildung 18 gezeigt wird, können die erwarteten Spaltprodukte DNP-Gly-Leu 43 und N,O-Di-DNP-Tyr 44 auf Grund der Retentionszeiten zugeordnet werden. Unter den angegebenen Bedingungen erscheint das dinitrophenylierte Dipeptid nach 21.5 min

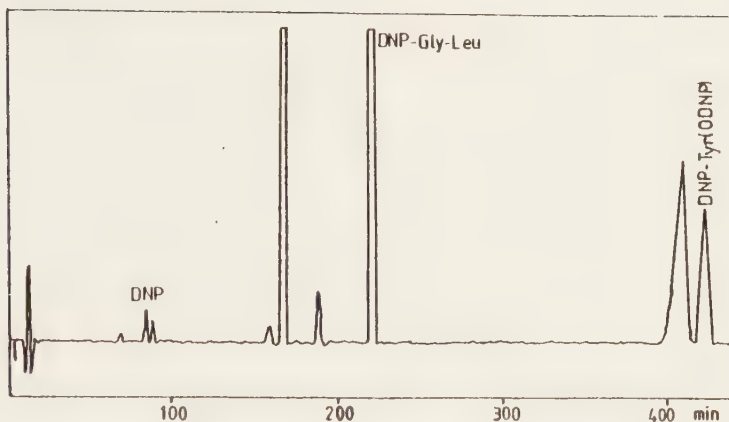
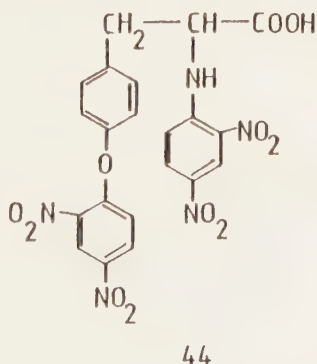
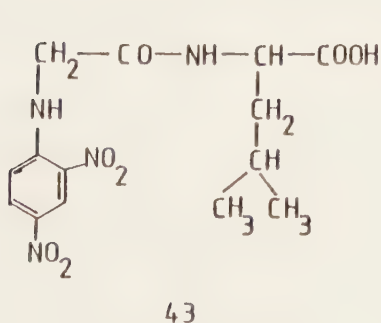


Abb. 18 HPLC des dinitrophenylierten DAP I -Hydroly= sats von Gly-Leu-Tyr

Konzentration 20 μ l, Säule RP-8 7 μ m, Länge 250 mm, Durchmesser 4.6 mm, Temperatur 60°C, Fließmittel Ace= tonitril/Essigsäure pH 2.5 bei einem Fluß von 3.5 ml/min Gradientenelution von 20% bis 60% Acetonitril in 60 min, Detektor UV III 360 nm bei einer Empfindlichkeit von 0.8



und das Aminosäurederivat nach 41.7 min. Das in der Re= aktion als Nebenprodukt entstandene Dinitrophenol tritt manchmal in zwei nahe beieinanderliegenden Banden auf.

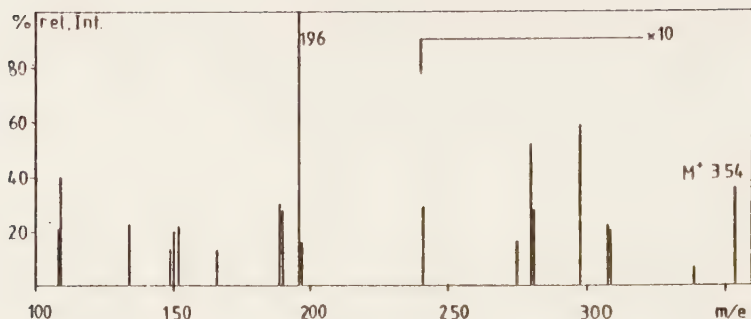


Abb. 19 Massenspektrum von DNP-Gly-Leu

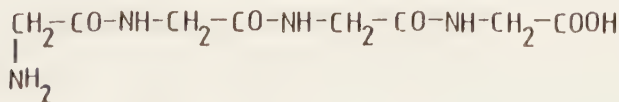
Die als derivatisierte Hydrolyseprodukte charakterisierten Banden werden zur zusätzlichen Sicherung noch massenspektrometrisch untersucht. Das Massenspektrum von DNP-Gly-Leu zeigt Abbildung 19. Das DNP-Dipeptid weist als Sequenzion S_1 m/e 196 aus. Damit ist die N-terminale Aminosäure als Glycin charakterisiert. Die C-terminale Aminosäure erhält man, indem man vom Molekülpeak M^+ die Massenzahl für das Sequenzion und m/e 28 (CO) abzieht. In dem hier gezeigten Beispiel ergibt sich für die C-terminale Aminosäure $m/e = 130$. Bedenkt man, daß noch ein Proton durch die Ausbildung der Säureamidbindung im Peptid verlorengegangen ist, so können der Masse $m/e = 130$ die Aminosäuren Leucin oder Isoleucin zugeordnet werden. Aus der Fragmentierung ist nicht eindeutig zu erkennen, daß als C-terminale Aminosäure Leucin vorliegt.

Für die dinitrophenylierte Aminosäure, die mittels der HPLC als di-dinitrophenyliertes Tyrosin charakterisiert wurde, weist das Massenspektrum die in der Literatur⁸⁶⁾ schon bekannten Fragmente aus. Ein Molekülpeak bei $m/e = 513$ wird nicht gefunden. Beherrschend ist das Fragment $m/e = 167$, das der von der Ätherbindung abgespaltenen DNP-Gruppe entspricht. Wichtig ist auch hier das

Erscheinen der Peaks bei $m/e = 273$ und $m/e = 240$, die sich aus der Spaltung des Moleküls zwischen dem α - und dem β -C-Atom ergeben.

Um feststellen zu können, bis zu welcher Konzentration ein HPLC-Nachweis der DNP-Produkte noch möglich ist, wurde von einer Tripeptidstammlösung mit 3.51 mg in 10 ml Puffer eine Verdünnungsreihe gemacht. Ein entsprechender Anteil davon wird durch DAP I hydrolysiert, mit DNFB derivatisiert und chromatographiert. Dabei wird ein Ansatz mit 20 nmol noch hydrolysiert und derivatisiert. Für die HPLC kann gezeigt werden, daß, setzt man quantitative Umsetzung dieses Hydrolysats während der Dinitrophenylierung voraus, die Nachweisgrenze für das DNP-Dipeptid bei 1 nmol liegt. Aussagen über die Erkennungsgrenzen in Abhängigkeit vom Injektionsvolumen, der Retentionszeit und dem Signal-Rausch-Verhältnis werden bei Krummen und Frei²³⁾ gemacht.

5.2 H-Gly-Gly-Gly-Gly-OH



45

Von diesem Tetrapeptid werden 3.6 μmol umgesetzt. Unter den schon bekannten Bedingungen kann im HPLC nach 39.5 Minuten DNP-Gly-Gly identifiziert werden. Abbildung 20 zeigt das Massenspektrum dieses Derivats. Der Basepeak $m/e = 196$ weist auch hier wieder DNP-Gly als N-terminale Aminosäure aus. Als Differenz zum Molpeak $m/e = 298$ bleibt $m/e = 102$. Eliminiert man noch $m/e = 28$ (CO), bleibt als C-terminale Aminosäure Glycin mit $m/e = 74$. Damit ist bestätigt, daß als dinitrophenyliertes Dipeptid DNP-Gly-Gly vorliegt.

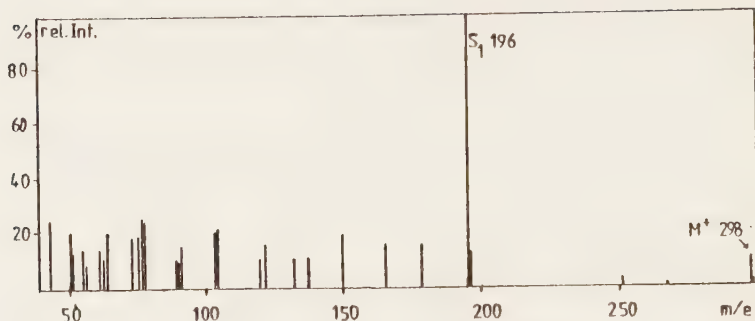


Abb. 20 Massenspektrum von DNP-Gly-Gly

An diesem Modellpeptid wird noch die Methode der Überlappenden Sequenzen gezeigt. Zu diesem Zweck wird das Peptid vor der Hydrolyse einem Abbauschritt nach Edman unterworfen unter Umsetzung mit p-Bromphenylisothiocyanat^{114), 115)} zur direkten massenspektrometrischen Identifizierung des p-Brom-PTH-Derivats. Die Verwendung substituierter Phenylisothiocyanate ist von Vorteil, denn im Massenspektrum können die Abbauprodukte mit den entsprechenden Isotopenpeaks leicht erkannt werden und von den sonstigen Reaktionsprodukten (z.B. N,N'-Diphenylthioharnstoff) unterschieden werden. Das Restpeptid wird dann hydrolysiert, derivatisiert und erneut chromatographiert. Jetzt werden sowohl in der Flachkammer-DC als auch in der HPLC zwei DNP-Derivate identifiziert, DNP-Gly und DNP-Gly-Gly. Das PTH-Derivat aus dem Edman-Abbau wird als p-Brom-PTH-Gly charakterisiert.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß das ein- gesetzte Peptid nur aus Glycin aufgebaut ist. Über die Kettenlänge des Peptids kann ausgesagt werden, daß es sich um mindestens vier Glycinreste handeln muß, denn beim Hydrolysieren mit DAP I erhält man nur Dipeptid, während nun beim Edman-Abbau ein Aminosäurerest (Gly)

entfernt wird, erhält man dann beim anschließenden Hydrolysieren wieder Dipeptid und einen weiteren Aminosäurerest (Gly). Ob vielleicht ein Hexa-, Octa- oder noch längeres Glycyl-Peptid vorliegt, kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

Die als Hydrolyseprodukte charakterisierten Banden werden zur zusätzlichen Sicherung noch massenspektrometrisch untersucht. Das Massenspektrum von DNP-Gly-Gly wurde schon diskutiert. DNP-Gly wird durch $M^+ 241$ und den Basepeak $m/e 196$ identifiziert⁸⁶⁾.

Schematisch ist also unter der Methode der Überlappenden Sequenzen das Folgende zu verstehen:

Ein Peptid mit den Aminosäuren A-B-C-D-E-F wird in einem ersten Versuch mit DAP I in Dipeptide A-B und C-D und E-F gespalten.

In einem zweiten Versuch wird das Peptid erst einem einzigen Edman-Abbau unterworfen zu einem PTH-Derivat, PTH-A und dem Restpeptid B-C-D-E-F.

Das Restpeptid wird nun wieder mit DAP I in Dipeptide B-C und D-E und F gespalten.

Ein Vergleich der Dipeptide aus Versuch eins und zwei zeigt nun die Überlappungen der Sequenz:

Versuch 1 A-B + C-D + E-F

Versuch 2 PTH-A + B-C + D-E + F .

5.3 Glukagon

Die Aminosäuresequenz des Peptidhormons Glukagon wurde von Bromer, Sinn und Behrens¹¹⁶⁾ mit 29 Aminosäuren angegeben. McDonald¹¹⁷⁾ und Callahan⁶⁴⁾ haben dieses Peptid schon einem Abbau mit DAP I unterworfen. Dabei erfolgte die Identifizierung der Spaltprodukte durch Elutionszeitenvergleich mit Standardpeptiden an basischen und neutralen-sauren Ionenaustauschersäulen. Eine weitere Grundlage zur Sicherung der Ergebnisse

bildete die Papierchromatographie. Hier liegen die Chromatogrammentwicklungszeiten zwischen 16 und 20 Stunden. Der Abbau wurde mit 0.25 mmol (875 mg) Glukagon in einer Zeitverlaufsanalyse über vier Stunden lang untersucht. Als Ergebnis wird der Abbau von acht Dipeptiden vom aminoterminalen Ende des Hormons beschrieben, der nach einer Stunde beendet zu sein scheint. Daneben sind im PC nach vierstündiger enzymatischer Hydrolyse auch noch die Aminosäuren Threonin, Leucin und Tyrosin zu erkennen.

Wir wiederholten diesen Versuch mit nur 2.7 μ mol (9.5 mg) Substanz in fünf ml Puffer. Nach 2, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten werden jeweils 0.5 ml des Hydrolyseansatzes inaktiviert, derivatisiert und mit Hilfe der HPLC untersucht. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. In Übereinstimmung mit Callahan⁶⁴⁾ ist nach 2 Minuten der Abbau von Gln-Gly 1 (3.8 min) und His-Ser 2 (7.6 min) erfolgt. Als nächstes erscheint Thr-Phe 3 (15.1 min). Aus der Zu- und Abnahme der Peakhöhe und aus den Retentionszeiten kann man schließen, daß nach 30 Minuten Hydrolysedauer Thr-Ser 4 (3.8 min) und Asp-Tyr 5 (20.1 min) durch das Enzym freigesetzt werden. Nach 90 Minuten ist mit dem Erscheinen von Asp-Ser 6 (3.5 min), Ser-Lys 7 (20.1 min) und Tyr-Leu 8 (40.2 min) der enzymatische Abbau abgeschlossen. Im Glukagon folgen jetzt in Position 17 und 18 zwei Argininreste. Hier greift DAP I nicht an. Nach 240 Minuten erscheinen im HPL-Chromatogramm Peaks, für die DNP-Aminosäuren diskutiert werden. Obwohl noch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet durchgeführt werden müssen, kann schon jetzt gesagt werden, daß mit Hilfe der HPLC-MS-Kombination eine Methode entwickelt worden ist, die eine schnelle und genaue Erkennung der Aminosäuresequenz eines Peptids ermöglicht. Besonders hervorzuheben ist außerdem der

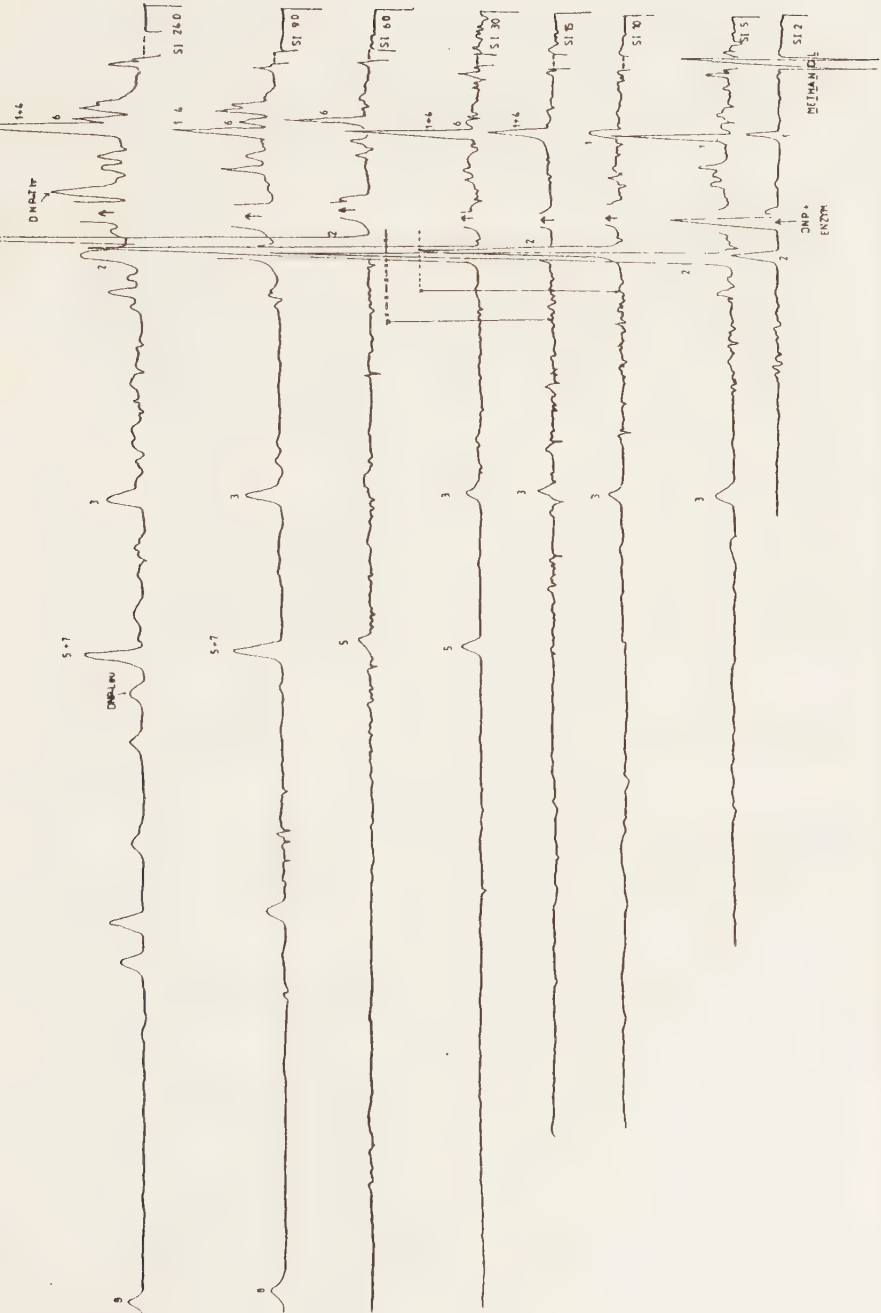


Abb. 21 Zeitverlaufs-HPL-Chromatogramme des enzymatischen Glukagonabbaus

Legende zu Abb. 21: Säule 7 m Lichrosorb RP 8; Fließmittel, Acetonitril-Essigsäure pH 2.5; Fluß, 2.0 ml/min Gradient, 20% bis 60% Acetonitril in 60 min.; Temperatur 60°C; Detektor, UV III 360 nm; DNP-Dipeptide 1 = Gln-Gly, 2 = His-Ser, 3 = Thr-Phe, 4 = Thr-Ser, 5 = Asp-Tyr, 6 = Asp-Ser, 7 = Ser-Lys, 8 = Tyr-Leu.

Vorteil des äußerst geringen Materialverbrauchs bei der enzymatischen Sequenzierung mit DAP I, wie beim Glukagonabbau gezeigt werden konnte.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Verbindungen werden mit der im allgemeinen Teil verwendeten Numerierung geführt.

Folgende Spektrometer wurden verwendet: IR- Gitter= spektrometer Perkin-Elmer 225; Angabe der Bandenlage in cm^{-1} . Kernresonanzspektrometer Varian HA 100 (^1H -NMR) und Bruker-Physik WH-9 (^{13}C -NMR). Alle chemischen Verschiebungen sind auf den internen Standard TMS = 0 ppm bezogen. Abkürzungen: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breites Signal. UV-Spektrometer Beckmann DK 2 und Gilford 240; angegeben sind λ_{max} in nm und in Klammern der Logarithmus der Extinktion ($\log \epsilon$). Massenspektrometer Varian-Mat CH 7a. Elektronenenergie 70 eV, Intensitäten des Molekül-Ions (M^+) und der häufigsten Fragment-Ionen sind in % des stärksten Signals (= 100%) angegeben.

Die Schmelzpunkte sind in offenen Kapillaren bestimmt und nicht korrigiert.

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium des Max-Planck Instituts für Biochemie in München, Abteilung für Peptidchemie, durchgeführt.

Die Drehwertmessungen wurden am Polarimeter Perkin-Elmer 241 MC durchgeführt.

Die HPRDC wurde mit dem CAMAG U-Kammer-System ausgeführt, dabei erfolgte die Probenaufgabe mit dem Nanomat.

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgelplat-

ten F 254/366 der Fa. Woelm durchgeführt. Für die HPRDC wurden Merck HPTLC Fertigplatten 60 F 254 für die Nano-DC benutzt. Für die Säulenchromatographie diente mit 10% Wasser desaktiviertes Kieselgel, feiner als 0.063 mm (Fa. Woelm).

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde mit einem Gerät der Fa. LDC, Constametri-Pumpen und einem Spektromonitor UV III-Detektor durchgeführt.

In der Enzymatik wurden die folgenden Geräte verwendet:

Photometer (Fa. Eppendorf) mit Kompensationsschreiber GS 11 (Fa. Eppendorf)

Wkf-Zentrifuge (G 50 K)

Sorvall RC 2-B Zentrifuge

Ultrazentrifuge B-60 (Fa. International-Equipment)

Fraktionskollektor und Schlauchpumpe (Variopræx, LKB)

pH-Meter, Modell E336 (Metrohm)

Elektrophoreseapparatur, Eigenbau des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Abteilung Prof. Dr. W. Zillig

Lyophilisator Modulyo (Fa. Edwards)

Fluoreszenz-Spektralphotometer MPF 3 (Fa. Perkin-Elmer)

Enzyme und Chemikalien:

DAP I wurde von der Fa. Boehringer Mannheim bezogen.

1.3-Dimethylimidazol-2-thion wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. Guglielmetti vom Laboratoire de synthèse organique de la Université de Bretagne occidentale Brest zur Verfügung gestellt.

^{15}N -Phenylisothiocyanat (4)

In eine Lösung von 5 g (53 mmol) ^{15}N -Anilin in 40 ml absol. Benzol wird bei -5°C unter mechanischem Rühren trockenes Ammoniakgas eingeleitet. Nach 10 min. läßt man aus einem Tropftrichter 6.8 ml (112 mmol) Schwefelkohlenstoff langsam zufließen. Weitere 2 Stdn. leitet man Ammoniak ein, dabei scheiden sich die gelblichen Kristalle des Ammoniumphenyldithiocarbamats ab. Unter fortgesetztem Rühren wird der überschüssige Ammoniak abgezogen. Die Kristalle werden abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 9 g (90 % d. Theor.) Schmp. 92°C (Zers.)

Das Ammoniumphenyldithiocarbamat wird in 60 ml absol. Benzol und 6 ml absol. Hexan bei 0°C suspendiert. Man läßt 45 ml einer 20 %-igen Phosgen-Lösung in Toluol innerhalb von 45 min. zutropfen. Nach beendeter Zugabe wird noch 45 min. gerührt, vom Ammonchlorid abgesaugt und das Lösungsmittel abgedampft. Nach einer Vakuum-Destillation erhält man 4.6 g (64 % d. Theor.) ^{15}N -Phenylisothiocyanat mit dem Sdp.₁₂ 110°C .

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der ^{15}N -, p-Brom- und p-Chlor-phenylthiohydantoine der Aminosäuren
A aus Aminosäuremethylestern

1 mmol Aminosäuremethylester wird in 3 ml Methanol gelöst und 0.12 ml (1 mmol) Phenylsenföl (^{15}N -Phenylsenföl) zugefügt. Das Reaktionsgemisch steht für mehrere Stunden bei Raumtemperatur (siehe Tabelle 2). Dann wird es mit wenig Wasser bis zur Trübung versetzt und steht für einige Stunden bei 0°C . Der Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet. Die Umkristallisation erfolgt aus Eisessig-Wasser oder aus Äthanol-Wasser.

2 mmol Aminosäuremethylester in 2 mmol Methanol werden mit 2 mmol p-Brom- oder p-Chlorphenylisothiocyanat in 3 ml Methanol wie oben umgesetzt.

B aus Aminosäuremethylester-Hydrochloriden

1 mmol Aminosäuremethylester-Hydrochlorid wird in 3 ml Methanol gelöst und mit 0.21 ml (1.5 mmol) Triäthylamin und 0.12 ml (1 mmol) Phenylsenföl (^{15}N -Phenylsenföl) versetzt. Das Reaktionsgemisch steht für mehrere Stunden bei Raumtemperatur (siehe Tab. 2) Dann wird es mit wenig Wasser bis zur Trübung versetzt und steht für einige Stunden bei 0°C . Der Niederschlag wird abgesaugt, getrocknet und umkristallisiert.

2 mmol Aminosäuremethylester-Hydrochlorid in 2 ml Methanol werden mit 3 mmol Triäthylamin und 2 mmol p-Brom- oder p-Chlorphenylisothiocyanat in 3 ml Methanol wie oben umgesetzt.

C aus der Aminosäure (mod. Lit.⁴²⁾

In einem 50-ml Erlenmeyer werden 1 g Aminosäure in 25 ml Pyridin-Wasser (1:1) unter Rühren gelöst bzw. suspendiert. Man stellt mit 1 n Natronlauge auf pH 9 ein. Die klare Lösung wird auf 40°C erwärmt und unter Rühren 0.24 ml/mmol Aminosäure Phenylsenföl zugetropft. In 30-40 min. wird unter stetigem Rühren tropfenweise 1 n Natronlauge zugegeben, so daß das pH bei 9 bleibt. Die Reaktion ist zu Ende, wenn das pH nicht mehr absinkt.

Das Überschüssige Phenylsenföl wird mit 3 x 10 ml Benzol extrahiert. In die wäßrige Lösung wird der insgesamt zugefügten Menge Natronlauge $1/3$ äquivalente Menge 1 n Salzsäure gegeben. Ein fester bis

schmieriger Niederschlag fällt aus. Das Lösungsmittel wird abrotiert (Badtemp. 60-70°C). Man gibt 15 ml 1 n Salzsäure zu und kocht 2 Stdn. im Ölbad am Rückfluß. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag abgesaugt, getrocknet und umkristallisiert.

PTH-Leu = 5-Isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin

Darstellung nach Methode A aus Leucimethylester, weiße Nadeln aus Äthanol mit Schmp. 178°C Lit.⁴⁶⁾ 178°C
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.03 (d, 3 H, CH₃), 1.88 (m, 3 H, CHCH₂), 4.32 (m, 1 H, Ring-CH), 7.24-7.5 (m, 5 H, arom.H), 7.96 (br, 1 H, NH).

IR (KBr): 3160 (NH), 2960 und 2930 (CH₃ und CH₂), 1755 (C=O), 1600 (Phenyl), 1520 (CSNH), 1500 (NH), 1410 (C=S), 1270 und 1250 (CSNH), 1190 (C-N).

UV (Äthanol): λ_{max} (log ε) = 268 (4.22), sh 230 (3.95)

C₁₃H₁₆N₂OS (248.4) Ber. C 62.87 H 6.49 N 11.28

Gef. C 63.12 H 6.31 N 11.33

p-Brom-PTH-Leu

Darstellung nach Methode B aus Leucinmethylester-Hydrochlorid,

weiße Nadeln aus Äthanol mit Schmp. 183-84°C

Lit.⁴⁷⁾ 178-79°C

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.03 (d, 3 H, CH₃), 1.9 (m, 3 H, CHCH₂), 4.32 (m, 1 H, Ring-CH), 7.2 (m, 2 H, o-aromat.H), 7.63 (m, 2 H, m-aromat.H), 7.92 (br, 1 H, NH).

IR (KBr): 3260 (NH), 2960 und 2930 (CH₃ und CH₂), 1760 (C=O), 1590 (Phenyl), 1525 (CSNH), 1490 (NH), 1410 (C=S), 1280 und 1260 (CSNH), 1190 (C-N).

UV (Äthanol): λ_{max} (log ε) = 2.26 (4.27), 268 (4.19).

C₁₃H₁₅BrN₂OS (327.3) Ber. C 47.71 H 4.62 N 8.56

Gef. C 47.80 H 4.74 N 8.99

p-Chlor-PTH-Leu

Darstellung nach Methode B aus Leucinmethylester-Hydrochlorid,

weiße Nadeln aus Äthanol mit Schmp. 170-72°C

Lit.⁴⁷⁾ 171-73°C

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.02 (d, 3 H, CH₃), 1.98 (m, 3 H, CHCH₂), 4.32 (m, 1 H, Ring-CH), 7.26 (m, 2 H, o-aromat.H), 7.47 (m, 2 H, m-aromat.H), 7.9 (br, 1 H, NH).

IR (KBr): 3250 (NH), 2960 und 2920 (CH₃ und CH₂), 1755 (C=O), 1595 (Phenyl), 1530 (CSNH), 1490 (NH), 1410 (C=S), 1280 und 1260 (CSNH), 1190 (C-N).

UV (Äthanol): λ max (log ε) = 2.23 (4.26), 269 (4.21)

C₁₃H₁₅ClN₂OS (282.8) Ber. C 55.22 H 5.35 N 9.91

Gef. C 55.43 H 5.70 N 10.01

Hexahydro-4-methoxycarbonyl-1-phenyl-6-oxo-2-thioxo-1,3-diazin (13)

Darstellung nach Methode A aus Asparaginsäuredimethyl-ester

Die Umkristallisation aus Methanol/Wasser ergibt weiße Nadeln vom Schmp. 185°C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.86 (aufgespaltenes d, 2 H, CH₂

J = 18 Hz, J = 9 Hz) und 3.12 (d, 1 H, J = 4 Hz), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 4.56 (m, 1 H, CH), 7.28-7.46 (m, 5 H, aromat.H), 7.71 (br, 1 H, NH).

IR (KBr): 3190 (NH), 2950 (CH₃ und CH₂), 1750 (C=O), 1730 (C=O), 1595 (Phenyl), 1510 (CSNH), 1410 (C=S), 1270 (CSNH), 1180 (C-N).

UV (Äthanol): λ max (log ε) = 267 (4.23), sh 230 (3.94)

MS (70 eV, 85°): m/e (% rel. Int.) = 265 (M⁺ + 1, 18), 264 (M⁺, 100), 233 (12), 205 (38), 204 (42), 203 (32), 191 (13), 173 (7), 146 (8), 136 (22), 135 (47), 119 (8), 104 (13), 91 (8), 85 (23), 77 (38), 74 (7), 59

(8), 51 (10), 28 (17).

$C_{12}H_{12}N_2O_3S$ (264.3) Ber. C 54.53 H 4.58 N 10.60
Gef. C 54.47 H 4.68 N 10.69

Hexahydro-4-methoxycarbonyl-1-p-bromphenyl-6-oxo-2-thioxo-1.3-diazin (13a)

Darstellung nach Methode A aus Asparaginsäuredimethyl-ester.

Die Umkristallisation aus Methanol/Wasser ergibt weiße Nadeln vom Schmp. 200°C.

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 2.85 und 3.12 (m, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 4.56 (m, 1 H, CH), 7.22 (m, 2 H, o-aromat.H), 7.57 (br, 1 H, NH), 7.62 (m, 2 H, m-aromat.H).

IR (KBr): 3340 (NH), 2950 und 2920 (CH_3 und CH_2), 1755 (C=O), 1710 (C=O), 1585 (Phenyl), 1500 (CSNH), 1410 (C=S), 1260 (CSNH), 1180 (C-N).

UV (Äthanol): λ max (log ϵ) = 224.5 (4.28), 267 (4.22)

MS (70 eV, 105°C): m/e (% rel. Int.) = 345 (M^+ + 1, 17), 344 (M^+ , 100), 343 (19), 342 (99), 313 (13), 311 (12), 285 (36), 284 (52), 283 (47), 282 (47), 281 (16), 271 (12), 269 (12), 216 (13), 215 (40), 214 (13), 213 (37), 203 (12), 199 (9), 197 (7), 184 (9), 182 (9), 175 (11), 157 (17), 155 (17), 145 (17), 135 (13), 134 (24), 117 (13), 112 (11), 102 (16), 90 (16), 86 (11), 85 (48), 84 (8), 76 (12), 75 (15), 74 (11), 70 (11), 63 (8), 59 (13).

$C_{12}H_{11}BrN_2O_3S$ (343.2) Ber. C 41.99 H 3.23 N 8.16
Gef. C 42.34 H 3.25 N 8.37

Hexahydro-4-methoxycarbonyl-1-p-chlorphenyl-6-oxo-2-thoxo-1.3-diazin (13b)

Darstellung nach Methode A aus Asparaginsäuredimethyl-ester.

Die Umkristallisation aus Methanol/Wasser ergibt weiße Plättchen vom Schmp. 203°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.88 und 3.14 (m, 2 H, CH_2), 3.8 (s, 3 H, OCH_3), 4.58 (m, 1 H, CH), 7.29 (m, 2 H, o-aromat.H), 7.48 (br, 1 H, NH), 7.69 (m, 2 H, m-aromat. H).

IR (KBr): 3200 (NH), 2960 und 2920 (CH_3 und CH_2), 1760 (C=O), 1730 (C=O), 1600 (Phenyl), 1520 (CSNH), 1490 (C-N), 1410 (C=S), 1270 (CSNH), 1170 (C-N).

UV (Äthanol): λ_{max} (log ϵ) = 222 (4.24), 267.5 (4.22).

MS (70 eV, 100°C): m/e (%rel. Int.) = 300 (M^+ + 2, 41), 299 (M^+ + 1, 18), 298 (M^+ , 100), 267 (12), 241 (20), 240 (24), 239 (24), 238 (50), 237 (23), 225 (13), 203 (11), 171 (18), 170 (20), 169 (50), 153 (10), 145 (13), 138 (14), 134 (11), 127 (11), 125 (8), 117 (12), 113 (13), 112 (14), 111 (31), 102 (14), 90 (8), 86 (10), 85 (45), 84 (8), 75 (20), 74 (12), 70 (10), 59 (13).

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ (298.8) Ber. C 48.25 H 3.71 N 9.38
Gef. C 48.21 H 3.96 N 9.43

PTH-Glu(OCH_3) = 3-Phenyl-2-thio-5-hydantoinpropion-säuremethylester 14

Darstellung nach Methode A aus Glutaminsäure-methyl-ester.

Die Umkristallisation aus Methanol/Wasser ergibt weiße Plättchen vom Schmp. 117°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.32 (m, 2 H, CH_2), 2.58 (t, 2 H, OC-CH_2), 3.73 (s, 3 H, CH_3O), 4.37 (t, 1 H, CH), 7.26

(m, 2 H, m-aromat.H), 7.46 (m, 3 H, o- und p-aromat.H), 7.81 (br, 1 H, NH).

IR (KBr): 3230 (NH), 2950 und 2840 (CH_3 und CH_2), 1755 (C=O), 1725 (C=O), 1595 (Phenyl), 1500 (NH), 1400 (C=S), 1260 (CSNH), 1185 (C-N).

UV (Äthanol): λ_{max} (log ϵ) = 268 (4.21)

MS (70 eV, 110°C): m/e (% rel. Int.) = 279 (M^+ , 1,17), 278 (M^+ , 99), 247 (13), 246 (55), 217 (11), 205 (36), 204 (64), 203 (47), 189 (12), 136 (37), 135 (65), 111 (65), 109 (17), 104 (11), 98 (13), 95 (12), 93 (13), 91 (12), 84 (73), 78 (12), 77 (100), 74 (24), 55 (16), 51 (33).

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (278.3) Ber. C 56.11 H 5.07 N 10.07
Gef. C 56.21 H 5.15 N 10.05

PTH-Glu(OCH_3) 14

Darstellung nach Methode A aus α -Glutaminsäuremethylester.

Nach säulenchromatographischer Reinigung mit Chloroform/Essigsäureäthylester (9:2) über Kieselgel wird in geringer Ausbeute der 3-Phenyl-2-thio-5-hydantoinpropionsäuremethylester erhalten. Die Substanz stimmt in allen Daten mit (14) überein.

PTH-Glu(OC_2H_5) = 3- Phenyl-2-thio-5-hydantoinpropionsäureäthylester 14a

Darstellung nach Methode A aus γ -Glutaminsäureäthylester.

Nach säulenchromatographischer Reinigung mit Chloroform/Essigsäureäthylester (9:2) über Kieselgel wird in geringer Ausbeute 14a erhalten mit dem Schmp. 134°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): = 1.29 (t, 3 H, CH_3), 2.3 (m, 2 H,

CH₂-CH), 2.52 (m, 2 H, CO-CH₂), 4.28 (q, 2 H, CH₂O),
~~4.35~~ (t, 1 H, CH).

C₁₄H₁₆N₂O₃S (292.4) Ber. C 57.52 H 5.52 N 9.58
 Gef. C 57.73 H 5.61 N 9.38

PTH-Ala = 5-Methyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (Nd.1)15

Darstellung nach Methode B aus Alaninmethylester-Hydrochlorid.

Die Umkristallisation aus Äthanol/Wasser ergibt weiße Nadeln mit dem Schmp. 176°C Lit.⁴⁶⁾ 185°C.

¹H-NMR (d₆ DMSO): δ = 1.40 (s, 3 H, CH₃), 4.46 (q, 1 H, CH), 7.27-7.44 (m, 5 H, arom.H), 10.56 (br, 1 H, NH).

IR (KBr): 3180 (NH), 2930 und 2910 (CH₃), 1750 (C=O), 1590 (Phenyl), 1520 (NH), 1400 (C=S), 1320 (S=C=N), 1265 (CSNH), 1190 (C-N).

UV (Äthanol): λ_{max} (log ε) = 268 (4.19), sh 229 (3.96).

MS (70 eV, 70°C): m/e (% rel. Int.) = 207 (M⁺ + 1, 21), 206 (M⁺, 100), 205 (32), 177 (23), 173 (11), 136 (18), 135 (73), 120 (15), 109 (10), 105 (15), 104 (16), 97 (10), 95 (8), 92 (10), 91 (12), 87 (22), 86 (19), 83 (10), 81 (10), 77 (59), 71 (10), 69 (12), 65 (8), 57 (15), 55 (11), 51 (19), 44 (19), 43 (14), 42 (7), 41 (10).

C₁₀H₁₀N₂OS (206.4) Ber. C 58.19 H 4.88 N 13.57
 Gef. C 58.18 H 5.19 N 13.50

3-Phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol-2-thion (15a)

Der zweite Niederschlag aus vorangegangenen Ansatz.

Bei der Umkristallisation bildet sich ein weißer, amorpher Niederschlag vom Schmp. 261°C.

¹H-NMR(d₆ DMSO): δ = 1.68 (s, 3H, CH₃), 7.27-7.44 (m, 5H,

aromat.H), 10.9 (br, 1H, NH).

IR (KBr): 3120 (NH), 2960 und 2880 (CH_3), 1750 (C=O), 1590 (Phenyl), 1515 (NH), 1400 (C=S), 1270 (CSNH), 1195 (C-N).

UV (Äthanol): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 279 (4.11), sh 269 (4.08).

MS (70 eV, 150°C): m/e (% rel. Int.) = 207 ($\text{M}^+ +1$, 17), 206 (M^+ , 100), 205 (17), 177 (2), 136 (30), 135 (11), 109 (8), 104 (6), 103 (6), 78 (9), 77 (27), 69 (5), 57 (5), 51 (9), 44 (8), 43 (7), 42 (23).

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$ (206.4) Ber. C 58.19 H 4.88 N 13.57

Gef. C 58.51 H 4.66 N 13.98

Gemisch 15a,b

3-Phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol-2-thion und

3-Phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol-2-thiol

3 mmol (618 mg) PTH-Ala werden in 15 ml Methanol unter Rühren suspendiert, dann werden 3 mmol (165 mg) Natriummethylat zugegeben. Der Ansatz färbt sich schwach gelb. Es wird für 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 30 ml Wasser zugegeben. Der Ansatz steht für weitere 24 Std. bei Raumtemperatur, danach wird der entstandene Niederschlag abgesaugt und über Kaliumhydroxid getrocknet.

Ausbeute: 350 mg (57% d. Theor.) Schmp. 275°C

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 Aceton): δ = 1.84 und 1.87 im Verhältnis 1 : 1 (s, 3H, CH_3), ca. 7.44 (m, 5H, aromat.H), 7.7 (br, 0.5H, OH), 8.43 (br, 0.5H, SH) und 9.73 (br, 1H, NH).

IR (KBr): 3130 (NH), 2960 und 2880 (CH_3), 1750 (C=O), 1590 (Phenyl), 1500 (NH), 1400 (C=S), 1250 (CSNH), 1190 (C-N).

UV (Äthanol): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 267.5 (4.12), sh 277 (4.09)

MS (70 eV, 160°C): m/e (% rel. Int.) = 208 ($\text{M}^+ +2,5$), 207 ($\text{M}^+ +1,13$), 206 (M^+ , 100), 205 (12), 136 (26),

135 (6.5), 109 (5), 104 (4), 103 (4), 78 (8), 77 (20),
51 (5), 44 (11), 43 (5), 42 (27), 41 (4), 32 (7),
31 (5).

$C_{10}H_{10}N_2OS$ (206.4) Ber. C 58.19 H 4.88 N 13.57
Gef. C 58.01 H 4.74 N 14.02

PTH-Ala 15

Die Darstellung erfolgt nach Methode B aus Alaninmethylester-Hydrochlorid, jedoch wird statt der Base Triäthylamin Natriummethylat eingesetzt.

Ausbeute: 343 mg (55% d. Theor.) Schmp. 181°C

Der Mischschmelzpunkt mit 15 ist identisch, ebenso das chromatographische und spektroskopische Verhalten.

3-Phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol-2-thion (15a)

5 mmol (696 mg) Alaninmethylester-Hydrochlorid werden in 15 ml Acetonitril fast vollständig gelöst (Ultraschallbad). Es werden 7.5 mmol (1.05 ml) Triäthylamin unter Rühren zugegeben und darauf 5 mmol (0.6 ml) Phenylsenföhl. Nach einer Stunde fällt Triäthylammoniumhydrochlorid aus. Von diesem Niederschlag wird nach achtzehnstündigem Stehen bei Raumtemperatur abgesaugt. Zum Filtrat werden 15 ml Wasser gegeben. Der Ansatz steht für 36 Std. bei Raumtemperatur. Der entstandene weiße Niederschlag wird abgesaugt.

Ausbeute: 526 mg (51% d. Theor.) Schmp. 265°C

Die Substanz stimmt in allen Daten mit Substanz 15a überein.

Am C5 des Thiohydantoinrings deuteriertes PTH-Ala

a) 5 mmol (696 mg) Alaninmethylester-Hydrochlorid

werden in 1 ml D₂O bei 0°C gelöst und 5 mmol (0.7 ml) Triäthylamin zugegeben. Der Ansatz steht für 18 Std. bei -18°C. Dann gibt man 5 ml Methanol dazu und 5 mmol (0.6 ml) Phenylsenföl. Nach zehn Minuten entsteht ein weißer Niederschlag, von dem sofort abgesaugt wird. Das chromatographische Verhalten ist in Übereinstimmung mit dem von PTH-Ala 15.

¹H-NMR (d₆ DMSO): δ = 1.36-1.43 (d, 3H), 1.39 (s, 3H), 4.46 (q, 1H), 7.23 - 7.51 (m, 5H), 10.53 (br, 1H).

65% PTH-Ala neben 35 % an C5-deutერიertem PTH-Ala.

MS (70 eV, 60°C): m/e (%rel.Int.) = 208 (M⁺ +1, 15), 207 (M⁺ und M⁺ +1, 70), 206 (91), 135 (96).

b) 2.5 mmol (348 mg) Alaninmethylester-Hydrochlorid werden in 2.5 ml Deuteromethanol gelöst und 3.75 mmol (0.5) ml Triäthylamin zugegeben. Der Ansatz steht für 16 Std. bei -18°C. Dann gibt man 2.5 mmol (0.3 ml) Phenylsenföl dazu. Es entsteht ein weißer Niederschlag, dessen chromatographisches Verhalten in Übereinstimmung mit dem von PTH-Ala 15 ist.

¹H-NMR (d₆ DMSO): Die Resonanzsignale wie unter a) ergeben 43% PTH-Ala neben 57% an C5-deutერიertem PTH-Ala.

MS (70 eV, 60°C): als Molekülpeaks treten m/e 207 und m/e 206 auf im Verhältnis von ca. 1 : 1.

c) Der Ansatz wird wie unter b) ausgeführt, jedoch wird bei Raumtemperatur gearbeitet.

¹H-NMR (d₆ DMSO): Die Resonanzsignale wie unter a) ergeben 35% PTH-Ala neben 65 % an C5-deutერიertem PTH-Ala.

Homoserinmethylester-Hydrochlorid

Die Veresterung von Homoserin erfolgt mit Methanol/Thionylchlorid nach Lit.^{33a)}.

Die Umkristallisation aus absolut. Methanol/absolut. Diäthylester ergibt weiße Nadeln vom Schmp. 194°C.
MS (70 eV, 80°C) m/e (% rel.Int.) = 134 (M⁺, fehlt), 88 (17), 74 (100), 57 (13), 56 (18), 44 (50.5), 43 (20), 42 (11), 38 (20), 36 (54), 28 (20).

C₅H₁₂ClNO₃ (169.6) Ber. C 35.41 H 7.13 N 8.26
Gef. C 34.85 H 5.90 N 10.19

PTC-hSer = Phenylthiocarbamoyl-homoserin 21

10 mmol DL-Homoserin werden in 50 ml Pyridin-Wasser (1:1) gelöst. Dann wird die Temperatur auf 40°C gebracht und 2.4 ml Phenylsenföl unter Rühren zugefügt. Durch Zugabe von 2 n Natronlauge wird das pH bei 8.6 gehalten. Nach ca. 30 min. ist die Reaktion beendet. Der Überschuß an Reagentien und Nebenprodukten wird mit Benzol extrahiert. Der zurückbleibenden wäßrigen Lösung wird portionsweise 0.5 n Salzsäure zugefügt, bis das pH den Wert 1 erreicht hat. Ein weißer Niederschlag fällt aus. Der Ansatz wird noch mehrere Stunden in der Kälte gehalten. Dann wird vom Niederschlag abgesaugt und dieser über Kaliumhydroxid getrocknet.

Ausbeute: 2.3 g (91% d. Theor.) Schmp. 164°C

¹H-NMR (d₆ DMSO): δ = 1.94 (m, 2 H, CH₂), 3.5 (t, 2 H, CH₂O), 4.7 (br, 1 H, OH), 7.44 (m, 5 H, arom.H), 7.94 (d, 1 H, NH), 9.77 (br, 1 H, NH-Aromat), 12.68 (br, 1 H, COOH), 4.96 (m, 1 H, CH)

IR (KBr): 3500 (OH), 3280 (NH), 2960 (CH₂), 2890 (CH), 1700 (COOH), 1590 (Phenyl), 1530 (CSNH), 1490 (NH), 1420 (C=S), 1250 (CSNH), 1185 (C-N), 750 (monosubst. Aromat).

UV (Äthanol): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) = 247 (4.11), 266 (4.13).
 MS (70 eV, 120°C): m/e (% rel. Int.) = 254 (M^+ , 8),
 238 (8), 237 (17), 236 (100), 235 (14), 207 (10), 205 (44),
 192 (14), 177 (15), 136 (25), 135 (85), 109 (12),
 104 (10), 99 (12), 93 (44), 92 (10), 91 (10), 78 (14),
 77 (60), 74 (12), 70 (10), 66 (12), 65 (10), 51 (19).
 $C_{11}H_{14}N_2O_3S$ (254.3) Ber. C 51.95 H 5.55 N 11.02
 Gef. C 51.86 H 5.47 N 10.90

PTH-hSer = 5-[2-Hydroxyäthyl]-3-phenyl-2-thiohydantoin (22)

Das PTC-hSer 21 wird in 20 ml 1 n Salzsäure für 10 min. unter starkem Rühren auf 80°C gebracht. Die entstandene klare Lösung wird mehrmals mit Essigsäure-äthylester extrahiert. Die vereinigten Essigsäure-äthylesterextrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel auf dem Wasserbad eingedampft. Es bilden sich weiße Plättchen vom Schmp. 148°C.

1H -NMR (d_6 DMSO): δ = 2.02 (m, 2 H, CH_2), 3.62 (t, 2 H, CH_2O), 4.46 (t, 1 H, CH), 4.7 (t, 1 H, OH), 7.3-7.44 (m, 5 H, arom.H), 10.47 (br, 1 H, NH).

IR (KBr): 3360 (OH), 3150 (NH), 2920 (CH_2), 1740 (C=O), 1595 (Phenyl), 1500 (CSNH), 1410 (C=S), 1320 (S=C=N), 1260 (CSNH), 1190 (C-N), 745 (monosubst.

Aromat).

UV (Äthanol): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) = 267 (4.22).

MS (70 eV, 85°C): m/e (% rel. Int.) = 237 (M^+ + 1, 12), 236 (M^+ , 100), 204 (33), 192 (11), 177 (13), 136 (18), 135 (51), 99 (11), 93 (13), 77 (42), 70 (10), 51 (13).

$C_{11}H_{12}N_2O_2S$ (236.3) Ber. C 55.91 H 5.12 N 11.86
 Gef. C 55.83 H 5.42 N 11.74

Gemisch 22a + 22b

Darstellung nach Methode B aus Homoserinmethylester-Hydrochlorid.

Die Reaktionszeit beträgt 120 Stdn., dabei bildet sich ein amorpher Niederschlag vom Schmp. 238°C (Zers.)

Ausbeute: 62 mg (26% d. Theor.)

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 DMSO): δ = 2.33 (m, 2 H, CH_2), 3.53 (m, 2 H, CH_2O), 4.81 (br, 1 H, OH), 7.23-7.43 (m, 5 H, arom.H), 10.66 (br, 2/3 H, OH, SH), 10.94 (br, 1/3 H, NH).

IR (KBr): 3460 (OH), 3250 (NH), 2920 und 2880 (CH_2), 1735 (C=O), 1590 (Phenyl), 1500 (NH), 1400 (C=S), 1230 (CSNH).

UV (Äthanol): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 267 (4.12), sh 277 (4.07)

MS (70 eV, 210°C): m/e (% rel. Int.) = 236 (M^+ , 42), 205 (33), 136 (17), 135 (33), 119 (9), 104 (10), 93 (13), 91 (10), 77 (35), 57 (11), 55 (11), 51 (9), 44 (83), 42 (7), 32 (27), 31 (25), 28 (39), 18 (100).

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (236.3) Ber. C 55.91 H 5.12 N 11.86

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}$ (254.3)

Ber. C 53.85 H 4.89 N 11.40

Gef. C 53.85 H 5.34 N 11.42

In diesem Gemisch ist Wasser gebunden im Verhältnis 2 Teile 20a,b und 1 Teil Wasser.

N-Methyl-3-phenyl-2-thio-5-methylhydantoin 23

3.74 mmol (577 mg) N-Methylalaninmethylester-Hydrochlorid werden in 6 ml Methanol gelöst. Es werden 5.61 mmol (0.79 ml) Triäthylamin hinzugefügt und darauf 3.74 mmol (0.45 ml) Phenylsenföl. Bei der Zugabe von Phenylsenföl färbt sich der Ansatz gelb. Der Ansatz steht für 24 Stdn. bei Raumtemperatur. Dabei bildet sich ein Niederschlag, der abgesaugt wird.

Ausbeute: 275 mg (33% d. Theor.) Schmp. 133-134°C
 $^1\text{H-NMR}$ (d_6 DMSO): δ = 1.50 (d, 3 H, CH_3), 3.28 (s, 3 H, N-CH_3), 4.48 (q, 1 H, CH), 7.44 (m, 5 H, arom.H).
IR (KBr): 3480 (N-CH_3), 2980 und 2930 (CH_3), 1750 (C=O), 1590 (Phenyl), 1500 (Phenyl), 1440 (C=S), 1320 (S=C=N), 1250 (CSN), 1200 (C-N).

UV (Äthanol): λ max ($\log \epsilon$) = 267 nm (4.12), 232.5 (4.01).

MS (70 eV, 85°C): m/e (% rel. Int.) = 221 (M^+ +1, 15), 220 (M^+ , 100), 219 (28), 191 (27), 187 (23), 136 (25), 135 (47), 131 (12), 109 (9), 104 (11), 91 (5), 77 (45), 57 (51), 56 (34), 51 (22), 42 (64).

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$ (220.3) Ber. C 59.98 H 5.49 N 12.72
Gef. C 59.79 H 5.41 N 12.86

1-Methyl-3-phenyl-4-hydroxy-5-methylimidazol-2-thion (23a)

Das Filtrat des vorangegangenen Ansatzes wird an Kieselgel-Platten im Laufmittel Chloroform/Essigsäure-äthylester (9:2) chromatographiert. Die Bande mit dem niedrigsten R_f -Wert wird mit Hilfe der HPLC gereinigt (Bedingungen: Trennsäule 250 x 46 mm, gepackt mit Lichrosorb SI 60 $7\ \mu\text{m}$; Elutionsmittel 70% Chloroform-30% Hexan, 1 ml/min., 560 PSI; UV-Detektor bei 254 nm, Retentionszeit 26 min.).

Ausbeute: 7.6 mg Schmp. 154°C

MS (70 eV, 70°C): m/e (% rel. Int.) = 221 (M^+ + 1, 10), 220 (M^+ , 48), 219 (9), 197 (4), 136 (8), 135 (7), 97 (8), 95 (8), 85 (13), 83 (11), 81 (12), 77 (19), 71 (18), 69 (20), 67 (8), 57 (46), 56 (100), 55 (24), 43 (26), 42 (18), 41 (19), 40 (21), 39 (9).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 DMSO): die Substanz wird zerstört, man findet die folgenden Resonanzen δ = 1.17 (d, 3 H),

1.47 (s, 3 H), 3.26 (s, 3 H), 3.99 (q, 1 H), 5.60 (d, 1 H, Austausch mit D₂O), 7.21-7.49 (m, 5 H).

¹H-NMR (CDCl₃): auch in diesem Lösungsmittel wird die Substanz zerstört, man findet die folgenden Resonanzen δ = 1.33 (d, 3 H), 1.60 (s, 3 H), 1.87 (d, 1 H, Austausch mit D₂O), 3.40 (s, 3 H), 4.16 (q, 1 H), 7.33-7.53 (m, 5 H).

Die dünnschichtchromatographische Überprüfung zeigt, daß das PTH-Derivat 23 entstanden ist.

Auch im HPLC zeigt sich unter den obigen Bedingungen eine Veränderung der Retentionszeit auf 33 min.

Ein erneutes Massenspektrum zeigt die folgenden Bruchstücke,

MS (70 eV, 85 °C): m/e (% rel. Int.) = 221 (M⁺ + 1, 8), 220 (M⁺, 49), 219 (8), 204 (13), 197 (6), 149 (14), 136 (6), 135 (4), 111 (10), 109 (9), 97 (16), 95 (13), 85 (14), 83 (17), 81 (16), 77 (10), 71 (26), 70 (10), 69 (23), 67 (11), 57 (46), 56 (100), 55 (27), 43 (27), 41 (25).

3-Phenyl-4-hydroxy-5-p-hydroxybenzylimidazol-2-thion (25a)

25a ist als Nebenprodukt in geringer Ausbeute bei der Darstellung von PTH-Tyr nach Methode B aus Tyrosin-methylester-Hydrochlorid entstanden. Es wird nach säulenchromatographischer Reinigung mit Chloroform/Essigsäureäthylester (1:1) über Kieselgel in geringer Ausbeute isoliert. Die Umkristallisation aus Methanol/Wasser ergibt einen amorphen Niederschlag mit einem Schmp. 281 °C am Aluminiumblock.

¹H-NMR (d₆ DMSO): δ = 3.42 (s, 2 H, CH₂), 6.6 (m, 2 H, N-Aromat) und 7.40 (m, 3 H, N-Aromat), 6.72 (m, 2 H, meta-H des Aminosäurearomaten) und 7.06 (m, 2 H,

ortho-H des Aminosäurearomaten), 11.05 (br, 1 H, NH).
IR (KBr): 3400 (OH), 3290 (NH), 2920 (CH₂), 1730
(C=O), 1590 (Phenyl), 1510 (NH), 1395 (C=S), 1260
(CSNH), 1200 (C-N).

UV (Äthanol): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) = 277 (4.17), sh 220 (4.27)
MS (70 eV, 210 °C): m/e (% rel. Int.) = 298 (M⁺, 14),
297 (5), 296 (22), 192 (41), 136 (16), 135 (8), 134
(7), 133 (43), 108 (11), 107 (100), 106 (10), 105
(10), 104 (12), 78 (15), 77 (57), 51 (17).

C₁₆H₁₄N₂O₂S (298.4) Ber. C 64.41 H 4.73 N 9.39
Gef. C 63.75 H 4.67 N 9.69

Isolierung von DAP I aus Rindermilz

Schritt 1: Saurer Extrakt

Von 3 kg frischer Rindermilz wird die Haut abgezogen.
Das Gewebe wird in kleine Streifen geschnitten und
zweimal durch einen Fleischwolf gedreht. Man erhält
1920 g Material, das mit 3820 ml Wasser versetzt wird,
in dem 2.3 g EDTA enthalten sind. Mit 45 ml 6 n H₂SO₄
wird das pH auf 3.5 eingestellt und der Ansatz für
eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das
pH erneut auf 3.5 eingestellt mit weiteren 22 ml 6 n
H₂SO₄. Bei 37°C wird für fünf Stunden gerührt und
dann der Ansatz 17 Stunden stehengelassen. Die über=
stehende Flüssigkeit wird abfiltriert und der Rest
bei 8000 U/min zentrifugiert bei 15°C. Damit hat man
den sauren Extrakt.

Schritt 2: 45% Ammonsulfatfällung

Zum sauren Extrakt (4660 ml) wird feingeriebenes Am=
monsulfat bis zu einer Sättigung von 45% (1193 g)
innerhalb von 30 min. portionsweise zugesetzt. Nach

vierstündigem Rühren bei Raumtemperatur wird 60 min. bei 8000 U/min. zentrifugiert bei 15°C.

70% Ammonsulfatfällung

Zum Überstand (4980 ml) wird feingemahlenes Ammonsulfat bis zu einer Sättigung von 70% (777 g) innerhalb von 30 min. portionsweise zugesetzt. Nach zehn Stunden bei Raumtemperatur wird 40 min. bei 8000 U/min. zentrifugiert bei 15°C. Der Niederschlag wird in 45 ml Wasser aufgenommen und gegen 0.9% Natriumchlorid dialysiert für drei Stunden bei Raumtemperatur. Man erhält damit 130 ml 45-70 Ammonsulfatfraktion.

Schritt 3: Hitzebehandlung

Die 40-70 Ammonsulfatfraktion wird 40 min. bei 65°C gerührt. Dann wird auf Eis abgekühlt und 35 min. mit 13000 U/min. bei 0°C zentrifugiert. Der klare Überstand (113 ml) bildet die Hitze fraktion.

Schritt 4: Ultrazentrifugation

Die Hitze fraktion wird neun Stunden mit 59000 U/min. bei 15°C zentrifugiert. Der Niederschlag wird in Puffer vom pH 6.8 aufgenommen und ergibt die UZ-Fraktion.

Schritt 5: Sepharose 6B-C.L.-Molekularsiebung

Die UZ-Fraktion wird auf eine Sepharose 6B-C.L.Säule, die mit Puffer vom pH 6.8 aus 0.005 m Natriumphosphat, 0.1 m Natriumchlorid 0.01 m EDTA und 0.001 m DDT äquilibriert ist, gegeben. Die Elution erfolgt mit Äquilibriumspuffer bei Raumtemperatur. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 36 ml/cm²Stdn. Die DAP I enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und konzentriert durch 80%ige Ammonsulfatfällung. Nach 30 min. wird der

Niederschlag durch Zentrifugation mit 8000 U/min. gesammelt und in 6 ml Wasser aufgenommen. Dialyse gegen 0.005 m Natriumacetatpuffer pH 5.0 ergibt die Sepharose-Fraktion.

Schritt 6: CM-Cellulose-Chromatographie

Auf eine CM-Cellulose-Säule, die mit Puffer vom pH 5.0 aus 0.005 m Natriumacetat und 0.001 m DDT äquilibriumiert ist, wird die Sepharose-Fraktion gegeben. Die Elution erfolgt mit einem Konzentrationsgradienten, der so hergestellt wird, daß in eine Mischungskammer, die 250 ml Äquilibriumierpuffer enthält, 0.35 m Natriumacetatpuffer mit 0.001 m DDT fließt. Auch diese Chromatographie kann bei Raumtemperatur ohne Aktivitätsverlust durchgeführt werden. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 12 ml/cm²Std. Die DAP I enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und konzentriert durch 80 %ige Ammonsulfatfällung. Nach 30 min. wird der Niederschlag durch Zentrifugation mit 8000 U/min. gesammelt und in einem ml Wasser aufgenommen. Dialyse gegen 0.9 % Natriumchlorid ergibt die CM-Fraktion. Nach Zusatz von 50 % Glycerin ist diese Fraktion über mehrere Monate bei -18°C stabil.

Enzymaktivität

Die Hydrolyseaktivität von DAP I wird fluorimetrisch nach McDonald⁵⁴⁾ mit Gly-Phe- β -naphthylamid als Substrat bestimmt.

Proteinbestimmung

Protein wird bei den ersten Anreicherungs-schritten mit der Biuret-Methode nach Beisenherz et al⁷⁴⁾, bei den Chromatographieschritten zum Teil nach Warburg und Christian⁷⁵⁾ bestimmt.

Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

a. Disk-Elektrophoresen

Disk-Elektrophoresen werden mit System 1 nach Maurer⁷⁶⁾ in zylindrischen Gelen (0.5 x 7 cm) durchgeführt.

b. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen werden in Plattengelen (130 x 115 x 16 mm) mit einer im Laboratorium von Zillig, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, entwickelten Apparatur durchgeführt. Zwischen zwei Glasplatten wird eine Mischung der beiden Gellösungen 1 und 2 von unten gepumpt, so daß von oben nach unten ein exponeller Gradient von 5 bis 25 % Acrylamid entsteht. Die Mischung der Gele wird aus einem geschlossenen Mischgefäß in den Plattenraum eingebracht. Die Zusammensetzung der Gellösungen entspricht weitgehend den Angaben Laemmli⁷⁷⁾.

Gellösung 1: 5% Acrylamid, 0.13% Methylenbisacrylamid, 0.75 m Tris-HCl, pH 8.8, 0.66% SDS, 0.2% (w/v) Tetramethyläthylendiamin (TEMED) und 0.25 mg Ammoniumpersulfat/ml.

Gellösung 2: 25% Acrylamid, 0.95% Methylenbisacrylamid, 0.75 m Tris-HCl, pH 8.8, 0.66% SDS, 0.01% (w/v) Tetramethyläthylendiamin (TEMED) und 0.25 mg Ammoniumpersulfat/ml.

Das Gradientengel wird mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen und ein weitmaschiges Obergel aufpolymerisiert. Durch einen Kunststoffkamm, der von oben zwischen die Platten gedrückt wird, werden die Taschen zum Auftragen der Proben gebildet.

Obergel: 3% Acrylamid, 0.08% Methylenbisacrylamid, 0.125 m Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.025% (w/v) Tetramethyläthylendiamin und 0.6 mg Ammoniumpersulfat/ml.

Die Elektrophorese erfolgt bei Raumtemperatur und 100 V. Danach werden die Gele 1 Std. bei 50°C in einem Färbabad aus 1.25 g Coomassie G 250, 454 ml 50% (v/v) Methanol und 46 ml Eisessig angefärbt und bei 50°C in einem Entfärbbad mit 7.5% Eisessig und 10% Methanol entfärbt.

Spaltansatz

Der Reaktionspuffer setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 40 µl 4% Pyridin, 79 µl Wasser, 40 µl 0.5% Essigsäure, 32 µl 0.1 n Salzsäure, 8 µl 0.375 m 2-mercaptoäthanol, 2 µl 0.1 m Na₂EDTA. Diese Mischung wird auf pH 5.0 mit Pyridin oder 0.5% Essigsäure eingestellt.

In dieser Puffermenge werden ein µmol Peptid oder Protein gelöst, fünf Minuten bei 37°C vorgewärmt und dann 3-5 Einheiten DAP I pro µmol Peptid oder Protein zugefügt. Die Reaktionszeit eines Gesamtverdaus beträgt drei bis vier Stunden bei 37°C. Die Enzymaktivität des Spaltansatzes wird abgebrochen, indem man den Ansatz eine Minute im siedenden Wasserbad hält und dann auf Eis stellt. Anschließend werden die flüchtigen Pufferbestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand in 2 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen, um die Dinitrophenylierung der Spaltprodukte durchzuführen.

Dinitrophenylierung

Der Rückstand des Spaltansatzes wird mit 0.2 ml 2 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung und 0.2 ml Dioxan versetzt. Darauf werden 0.2 ml Dioxan enthaltend 2-5 mg Dinitrofluorbenzol zugefügt und kräftig geschüttelt. Der Ansatz steht über Nacht im Dunkeln. Dann gibt man weitere 1 ml 2 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung dazu

und extrahiert einmal mit 2 ml Äther und zweimal mit 1 ml Äther. Die wäßrige Phase wird mit zwei Tropfen 5 n Salzsäure angesäuert und die DNP-Dipeptide mit Essigsäureäthylester (3 x 1 ml) extrahiert.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Probleme auf dem Gebiet der Sequenzanalyse von Peptiden untersucht.

Bei der automatischen Peptidsequenzierung nach Edman ist die quantitative Bestimmung der entstehenden Phenylthiohydantoine bis heute noch nicht sicher möglich. Deshalb wurde die quantitative massenspektrometrische Bestimmung mit Hilfe ^{15}N -markierter Phenylthiohydantoine als innerer Standard untersucht. Dazu wurde eine allgemeine Synthese für die Darstellung der ^{15}N -Phenylthiohydantoine der Aminosäuren erarbeitet. Es wurde gezeigt, daß Aminosäuremethylester und -Hydrochloride mit Phenylisothiocyanat in methanolischer Lösung bei Raumtemperatur in hoher Ausbeute zu den Phenylthiohydantoinderivaten reagieren. Dabei wurde besonders bei der Reaktion von Alanin- und Homoserinmethylesterhydrochlorid mit Triäthylamin und Phenylisocyanat das Auftreten isomerer Strukturen, die auf eine Keto-Enol- und Amid-Imid-Tautomerie zurückzuführen sind, beobachtet.

Zur Sequenzierung von Peptiden wurde das schon beschriebene Enzym Dipeptidylaminopeptidase I aus Rindermilz isoliert und gereinigt. Studien zur weiteren Charakterisierung wurden abgebrochen, als das Enzym käuflich erhältlich wurde.

Dieses Enzym spaltet nacheinander vom Aminoende eines Peptids Dipeptide ab, die getrennt und charakterisiert werden müssen. In dieser Arbeit wurden die Dipeptide in dinitrophenylierte Dipeptide überführt, diese durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie

getrennt und massenspektrometrisch charakterisiert.

Dazu wurde eine große Anzahl von DNP-Dipeptiden dargestellt und gereinigt. Durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an reversed phase im System Acetonitril-Essigsäure gelingt, eine Gruppentrennung der DNP-Dipeptide durchzuführen. Die Retentionszeiten bzw. die k-Werte geben bereits einen Hinweis auf die Aminosäuresequenz der Dipeptide. Da das Elutionsmittel salzfrei ist, können die eluierten Fraktionen unmittelbar für die massenspektrometrische Identifizierung verwendet werden.

Mit Hilfe der bekannten DNP-Dipeptide wurde deren massenspektrometrische Fragmentierung untersucht. Es ergibt sich, daß die Sequenz der meisten DNP-Dipeptide eindeutig geklärt werden kann. In einigen Fällen ist die Kenntnis der Retentionszeiten aus der Hochdruckflüssigkeitschromatographie zusätzlich erforderlich.

An einigen Oligopeptiden und an Glukagon wurde die enzymatische Spaltung mit Dipeptidylaminopeptidase I durchgeführt und damit die Trennungs- und Identifizierungsmethode geprüft und bestätigt.

Damit wird ein Verfahren zur Sequenzierung von Peptiden vorgestellt, das nach weiterer Erfahrung zur Routinemethode werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

1. P. Edman, Acta Chem. Scand. 4, 277 (1950)
2. V.M. Ingram, J. Chem. Soc. 3717 (1953)
3. B.S. Hartley und V. Massey, Biochim. Biophys. Acta 21, 58 (1956)
4. F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945)
5. M.J. Mycek, Methods Enzymol. 19, 285 (1970)
6. H. Zuber, Methods Enzymol. 45, 561 (1976)
7. A. Levy und D. Chung, Anal. Chem. 25, 396 (1953)
8. G. Pataki in Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Herausg. K. Fischer, Walter de Gruyter und Co. Verlag, Berlin, 1966
9. H. D. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
10. H. Michl, Monatsh. Chem. 82, 489 (1951)
11. H. Determann in Gelchromatographie, Springer-Verlag, Berlin, 1967
12. T. Bibring und J. Baxandall, Anal. Biochem. 85, 1 (1978)
13. F. Sanger, Biochem. J. 45, 563 (1949)

14. W.R. Gray, *Methods Enzymol.* 11, 139 (1967)
15. H. Nau, *Angew. Chem.* 88, 74 (1976)
16. K.R. Leimer, R.H. Rice und C.W. Gehrke, *J. Chromatog.* 141, 121 (1977)
17. P. Edman und G. Begg, *Eur. J. Biochem.* 1, 80 (1967)
18. J.K. McDonald, B.B. Zeitman, T.J. Reilly und S. Ellis, *J. Biol. Chem.* 244, 2693 (1969)
19. P.X. Callahan, J.K. McDonald und S. Ellis, *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31, 1105 (1972)
20. G.M. Schier, P.D. Bolton und B. Halpern, *Biomed. Mass Spectrom.* 3, 32 (1976)
21. R.M. Caprioli, W.E. Seifert Jr. und D.E. Sutherland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 67 (1973)
22. I. Molnar und C. Horvath, *J. Chromatog.* 142, 623 (1977)
23. K. Krummen und R.W. Frei, *J. Chromatog.* 132, 429 (1977)
24. Dixon, *Proc. Chem. Soc. (London)* 55, 301
bzw. Beilstein
25. K.H. Slotta und H. Dressler, *Chem. Ber.* 63, 888 (1930)
26. F.B. Dains, R.Q. Brewster und C.P. Olander, *Org.*

Syn. 1, 447 (1964)

27. G.J.M. van der Kerk, C.W. Plyers und G. de Vries,
Org. Syn. 5, 223 (1965)
28. E. Fischer und B. Helferich in Anleitung zur
Darstellung organischer Präparate, 11. Auflage,
S. 9, Fr. Vieweg und Co. Verlag, Berlin 1947
29. L. Gattermann und H. Wieland in Die Praxis des
organischen Chemikers, 32. Auflage, S. 157,
Walter de Gruyter und Co. Verlag, Berlin 1947
30. S. Sakai, T. Fujinami und T. Aizawa, Bull. Chem.
Soc. Jap. 48, 2981 (1975)
31. C.S. Dean, D.S. Tarbell und A.W. Friedenberg,
J. Org. Chem. 35, 3393 (1970)
32. E. Fischer, Chem. Ber. 39, 2893 (1906)
- 33a. M. Brenner, H.R. Müller und W. Pfister, Helv.
Chim. Acta 33, 568 (1950)
- 33b. M. Brenner und W. Huber, Helv. Chim. Acta 36,
1109 (1953)
34. K.H. Deimer in Methoden der organischen Chemie
(Houben-Weyl-Müller), 4. Auflage, Bd. XV/1,
S. 317, Thieme-Verlag, Stuttgart 1974
35. H. Peter et al., Helv. Chim. Acta 46, 577 (1963)
36. N.C.Davis, J. Biol. Chem. 233, 935 (1956)
37. G. Hillmann, Z. Naturforschung A 1, 682 (1946)

38. E. Sondheimer und R.W.Holley, J. Amer. Chem. Soc. 76, 2467 (1954)
39. H. Gibian und E. Klieger, Liebigs Ann. Chem. 640, 145 (1961)
40. E. Klieger und H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. 655, 195 (1962)
41. W.E. Hanby, S.G.Walley und J. Watson, J. Chem. Soc. 1950, 3239
42. P. Edman, Acta Chem. Scand. 4, 283 (1950)
43. A.L. Levy und D. Chung, Biochim. Biophys. Acta 17, 454 (1955)
44. E. Cherbuliez, J. Marszalek und J. Rabinowitz, Helv. Chim. Acta 47, 1666 (1964)
45. M. Schneider und H. Tschesche, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1339 (1976)
46. P. Edman in S.B. Needleman Protein Sequence Determination 1. Auflage, Bd. 8, S. 219, Springer-Verlag Berlin 1970
47. F. Weygand und R. Obermaier, Eur. J. Biochem. 20, 72 (1972)
48. E. Gross und B. Wittkop, J. Amer. Chem. Soc. 83, 1510 (1961)
49. G. Roseau und P. Pantel, J. Chromatog. 44, 392 (1969)

50. W. Schäfer und E. Bauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1307 (1973)
51. L. Knorr, Angew. Chem. 34, 269 (1921)
52. B.R. Baker et al., J. Amer. Chem. Soc. 77, 1 (1955c)
53. G. Hesse in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), 4. Auflage, Bd. VI/1d, S. 201, Thieme-Verlag Stuttgart 1978
54. B. Africa und F.H. Carpenter, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 113 (1956)
55. P. Edman, Acta Chem. Scand. 10, 761 (1956)
56. L.K. Ramachandran, A. Epp und W.B. McConnell, Anal. Chem. 27, 1734 (1955)
57. H.S. Kimmel und A. Saifer, Anal. Biochem. 9, 316 (1964)
58. H. Schwarz und F.H. Bumpus, J. Amer. Chem. Soc. 81, 890 (1956)
59. G. Patai, Chimia 18, 23 (1964)
60. B. Wittmann-Liebold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1415 (1973)
61. M.R. Summers, G. W. Smythers und S. Oroszlan, Anal. Biochem. 53, 624 (1973)
62. D. Bucher, Chromatographia 10, 723 (1977)

63. U. Hezel, J. Blome, H. Halpaap, D. Jaenchen, R. E. Kaiser, J. Rippahn in Einführung in die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie, Eigenverlag des Instituts für Chromatographie, Bad Dürkheim 1976
64. B. Blömbäck, M. Blömbäck, P. Edman und B. Hessel, Biochim. Biophys. Acta 115, 371 (1966)
65. R.M. Mettrione, A. Neves und J.S. Fruton, Biochemistry 5, 1597 (1966)
66. Biochemica-Dienst Nr. 31, Juli 1976 (Boehringer Mannheim GmbH)
67. V. Izumiya und J.S. Fruton, J. Biol. Chem. 218, 59 (1956)
68. J.S. Fruton und M.J. Mycek, Arch. Biochem. Biophys. 65, 11 (1956)
69. R.J. Planta, J. Gorter und M. Gruber, Biochim. Biophys. Acta 89, 511 (1964)
70. J.K. McDonald, T.J. Reilly, B.B. Zeitman und S. Ellis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 771 (1966)
71. R.J. Planta und M. Gruber, Anal. Biochem. 5, 630 (1963)
72. M.E. Jones, W.R. Hearn, M. Fried und J.S. Fruton, J. Biol. Chem. 195, 645 (1952)
73. J.K. McDonald, P.X. Callahan, B.B. Zeitman und

- S. Ellis, J. Biol. Chem. 244, 6199 (1969)
74. G. Beisenherz, H.J. Boltze, T. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer, Z. Naturforschung 86, 555 (1953)
75. W. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. 310, 384 (1942)
76. H.R. Maurer in Methods of Analytical Disk Electrophoresis, Tabelle 4 Nr. 1 S. 44, 2. Auflage, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin 1971
77. U.K. Laemmli, Nature 227, 680 (1970)
78. P.X. Callahan, J.K. McDonald und S. Ellis, Methods Enzymol. 25, 282 (1972)
79. H.C. Krutsch und J.J. Pisano, Methods Enzymol. 47, 391 (1977)
80. W.E. Seifert Jr. und R.M. Caprioli, Biochem. 17, 436 (1978)
81. Y.A. Ovchinikov und A.A. Kiryashkin, Febs Lett. 21, 300 (1972)
82. P.X. Callahan, J.A. Shepard, T.J. Reilly, J.K. McDonald und S. Ellis, Anal. Biochem. 38, 330 (1970)
83. H.C. Kruttsch und J.J. Pisano, Biochem. 17, 2791 (1978)
84. D.J. Edwards in Handbook of Derivatives for Chromatography

- matography, Herausg. K. Blau und G. King, S. 391, Heyden a. Son Ltd. London 1977
85. S.-I. Ishii und B. Wittkop, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1832 (1963)
 86. M.H. Studier, L.P. Moore, R. Hayatsu und S. Matsuka, Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 894 (1970)
 87. R.L. Munier und G. Sarrazin, J. Chromatog. 22, 347 (1966)
 88. L. Kesner, E. Muntwyler, G.E. Griffin und P. Quaranta, Methods Enzymol. 11, 94 (1967)
 89. J.E. Smith, J.D. Lane, P.A. Shea, W.J. McBride und M.H. Aprison, Anal. Biochem. 64, 149 (1975)
 90. C.L. Zimmermann und J.J. Pisano, Methods Enzymol. 47, 45 (1978)
 91. E.P. Kroeff und D.J. Pietrzyk, Anal. Chem. 50, 502 (1978)
 92. K. Krummen und R.W. Frei, J. Chromatog. 132, 27 (1977)
 93. D.J. Pietrzyk, E.P. Kroeff und T.D. Rotsch, Anal. Chem. 50, 497 (1978)
 94. C. Horvath, W. Melander und J. Molnar, J. Chromatog. 125, 129 (1976)
 95. W.S. Hancock, C.A. Bishop, R.L. Prestidge, D.R.K.

- Harding und M.T.W. Hearn, J. Chromatog. 153, 391 (1978)
96. E.P. Kroeff und D.J. Pietrzyk, Anal. Chem. 50, 1353 (1978)
97. R.F. Rekker in The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam - New York S.301 (1977)
98. A. Leo, C. Hansch und D. Elkins, Chem. Rev. 71, 525 (1971)
99. Y. Nozaki und C. Tanford, J. Biol. Chem. 246, 2211 (1971)
100. E. Lederer und B.C. Das in Peptides, Ed. H.C. Beyerman, A. van de Linde, W. Maassen van den Brink, S. 131, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1967
101. M. Barber, P. Jolles, E. Vilkas und E. Lederer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 469 (1965)
102. D.W. Thomas, B.C. Das, S.D. Géro und E. Lederer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 199 (1968)
103. S.R. Burzynski, Anal. Biochem. 70, 359 (1976)
104. H. Nau, H.J. Förster, J.A. Kelley und K. Biemann, Biomed. Mass Spectrom. 2, 326 (1975)
105. G.Hudson und K. Biemann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 212 (1976)
106. J.A. Kelley, H. Nau, H.J. Förster und K. Biemann,

- Biomed. Mass Spectrom. 2, 313 (1975)
107. E. Bricas, J. van Heijenoort, M. Barber, W.A. Wolstenholme, B.C. Das und E. Lederer, Biochem. 4, 2254 (1965)
108. H.F. Grützmaker und K. Heyns, Leibigs Ann. Chem. 698, 24 (1966)
109. J.H. Jones, Quart. Reviews 22, 302 (1968)
110. W.R. Gray, L.H. Wojcik und J.H. Futrell, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1111 (1970)
111. A.A. Kiryushkin, H.M. Fales, T. Axenrod, E.J. Gilbert und G.W.A. Milne, Org. Mass Spectrom. 5, 19 (1971)
112. M. Mudgett, D.V. Bowen, F.H. Field und T.J. Kindt, Biomed. Mass Spectrom. 4, 159 (1977)
113. H.C. Krutzsch und T.J. Kindt, Anal. Biochem. 92, 525 (1979)
114. H. Tschesche und E. Wachter, Eur. J. Biochem. 16, 187 (1970)
115. F. Weygand und R. Obermaier, Eur. J. Biochem. 20, 72 (1971)
116. W.W. Bromer, L.G. Sinn und O.K. Behrens, J. Amer. Chem. Soc. 79, 2807 (1957)
117. J.K. McDonald, P.X. Callahan und S. Ellis, Methods Enzymol. 25, 272 (1972)

Lebenslauf

- Name: Marina Hartmann, geb. Glibmann
- Geburt: Am 12.3.1951 als Tochter des Maschinen=
schlossers Fred Glibmann und seiner
Ehefrau Irene, geb. Brehm, in Berlin.
- Volksschule: September 1957 bis Juli 1958 in Berlin
Januar 1959 bis März 1961 in Lübeck
- Oberschule: April 1961 bis Juni 1963 in Lübeck
Juni 1963 bis zur Reifeprüfung im Januar
1970 in Hamburg-Blankenese
- Studium: ab Sommersemester 1970 Studium der Che=
mie/Physik an der Universität München;
ab Sommersemester 1971 Studium der Le=
bensmittelchemie;
Lebensmittelchemische Vorprüfung im Mai
1973; Teil A der Hauptprüfung für Le=
bensmittelchemiker im Februar 1975.
Ab September 1975 Dissertation am Max=
Planck-Institut für Biochemie, Abteilung
für Organische Chemie und Spektroskopie,
Martinsried bei München.
- Heirat: November 1974

